

JOSÉ EDUARDO DA SILVA SANTOS

**ALTERAÇÕES DE LONGA DURAÇÃO NA
RESPONSIVIDADE VASCULAR A VASOCONSTRIÇÕES E
A VASODILATAÇÃO INDUZIDAS PELA INFUSÃO DE
DOADORES DE ÓXIDO NÍTRICO: ENVOLVIMENTO DE
CANALIS DE POTÁSSIO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Jamil Assreuy

FLORIANÓPOLIS

1999

“ALTERAÇÕES DE LONGA DURAÇÃO NA RESPONSABILIDADE VASCULAR A VASOCONSTRITORES E A VASODILATADORES INDUZIDAS PELA INFUSÃO DE DOADORES DE ÓXIDO NÍTRICO: ENVOLVIMENTO DE CANAIS DE POTÁSSIO”

POR

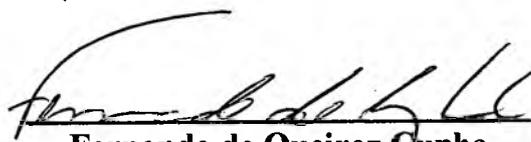
JOSÉ EDUARDO DA SILVA SANTOS

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pela Banca Examinadora em sessão de defesa pública em 24 de Fevereiro de 1999.

Banca Examinadora:



**Jamil Assreuy Filho
(FMC/UFSC-Membro Titular)**



**Fernando de Queiroz Cunha
(FMRP/USP -Membro Titular)**



**Giles Alexander Rae
(FMC/UFSC-Membro Titular)**

**e
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação**

Florianópolis, 24 de Fevereiro de 1999.

SILVA-SANTOS, José Eduardo. **Alterações de longa duração na responsividade vascular a vasoconstritores e a vasodilatadores induzidas pela infusão de doadores de óxido nítrico: envolvimento de canais de potássio.** Florianópolis, 1999, 105p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: Prof. Jamil Assreuy

Defesa: 24/02/1999

Avaliação do envolvimento do [óxido nítrico] nas alterações da responsividade vascular existentes durante o [choque séptico]. Neste estudo desenvolvemos um modelo experimental que consistiu na infusão de doadores de óxido nítrico (nitroprussiato de sódio ou S-nitroso-acetil-DL-peninilamina), para simular a exposição do sistema cardiovascular a quantidades de óxido nítrico superiores às fisiológicas. A infusão de doadores de óxido nítrico induziu um estado de hiporresponsividade a agentes [vasoconstritores] (como a fenilefrina e as angiotensinas I e II) e de hiper-responsividade à substâncias [vasodilatadoras] [endotélio-dependentes] (como a bradicinina e a acetilcolina), o que persistiu por pelo menos 24 horas. Estes fenômenos parecem decorrer, ao menos em parte, da ativação de [canais de potássio] sensíveis aos bloqueadores 4-aminopiridina e/ou tetraetilamônio. Os resultados demonstram que a exposição ao óxido nítrico, por um período relativamente curto (30 minutos), é capaz de mimetizar as alterações na responsividade vascular existentes durante o choque séptico e que a ativação de canais de potássio é responsável, ao menos por parte destas alterações. Estudos direcionados à relação entre o óxido nítrico, modificações na atividade de canais de potássio e alterações no funcionamento cardiovascular podem propiciar novas perspectivas para o tratamento do choque séptico.

A Deus,

Por mostrar caminhos,

permitir sonhos e

concretizar a vida...

Este trabalho é dedicado à minha família e à namorada Sayuri:

Aos meus pais, Alcides e Lucia, pela educação que me foi dada e pelo persistente estímulo e carinho ao longo de todos os anos da minha vida. Amo vocês!

À Sayuri, pela paciência, compreensão e companhia sempre presente. Amo você!

Agradecimentos

Ao prof. Dr. Jamil Assreuy, pela oportunidade, paciência, ensinamentos e confiança. Pelo exemplo como pesquisador e, acima de tudo, como educador.

À prof^a. Dra. Maria Consuelo de Andrade Marques, pela primeira aula de Farmacologia na Universidade Federal do Paraná. Por mostrar o fascínio da ciência e da Farmacologia; por ensinar sem almejar retorno; por acreditar e abrir caminhos; por tornar possível esta pós-graduação. Este trabalho também é seu!

À prof^a. Dr^a. Lia Rieck, pelo apoio, incentivo e confiança.

À prof^a. Dr^a. Ana Maria Soares, pelo convívio nos primeiros anos de pesquisa.

Ao prof. Dr. João Batista Calixto, por permitir o primeiro contato com a pós-graduação através de um estágio em seu laboratório e por disponibilizar equipamentos, drogas e espaço físico na etapa inicial deste estudo.

Ao prof. Dr. Giles Alexander Rae, pelo incentivo, dicas e sugestões.

Aos demais professores do Curso de Pós-graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina. Por este início de formação acadêmica.

À Rosana e à Daniela, pela acolhida e por compartilharem comigo um pouco de seus conhecimentos. Ao Adair, por dividir seu espaço, possibilitando a realização de muitos experimentos.

Aos amigos da “turma de mestrado 97”, Adriana, Alessandra, Elke, Nelson e Rafaela. Pelas experiências compartilhadas e pela permuta de conhecimentos ao longo dos últimos dois anos. Ao Nelson pelas inúmeras viagens (caronas) e produtivas conversas.

A todos os colegas que fizeram ou fazem parte deste curso de pós-graduação, pela companhia quase diária e conversas pelos corredores. À Néia, pelas mesmas razões e, principalmente, pelo apoio e amizade.

Aos amigos que estiveram ou estão presentes no laboratório: Fernanda, Vanessa, Cláudia, Terezinha, Danielle, Márcia, Rodrigo, Januária, Daniel, Adriane e Renata. Pela paciência e convívio diário.

Ao Dr. Edson Antunes (UNICAMP, Campinas, SP), à Dr. Maria Cristina O. Salgado e ao Dr. Fernando Q. Cunha (Faculdade de Medicina, USP, Ribeirão Preto, SP), pela gentil doação de drogas valiosas e importantes para a concretização deste e de outros estudos.

À Bayer[®] (São Paulo, SP, Brasil), pelo fornecimento do Ronpum[™], para a anestesia de todos os animais empregados neste trabalho.

A todos os funcionários do Departamento de Farmacologia e, em especial, aos responsáveis pelo biotério, cuja dedicação diária tornou possível a realização deste trabalho.

LISTA DE TABELAS

1	Hiporresponsividade inicial e tardia à vasoconstrição Induzida pela fenilefrina em ratos endotoxêmicos.....	51
2	Potencialização inicial e tardia dos efeitos vasodilatadores da bradicinina em ratos endotoxêmicos.....	51
3	Efeitos da infusão de PBS (20 µl/min), SNP (250 nmol/kg/min), SNAP (85 nmol/kg/min) ou NAP (85 nmol/kg/min) sobre os níveis de NO _x em ratos anestesiados.....	56
4	Efeitos do pré-tratamento com bloqueadores de canais de potássio sobre a responsividade vascular à fenilefrina em ratos anestesiados infundidos com PBS ou nitroprussiato de sódio.....	63
5	Efeitos do pré-tratamento com bloqueadores de canais de potássio sobre a responsividade vascular à bradicinina em ratos anestesiados infundidos com PBS ou nitroprussiato de sódio.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS

EDHF	– fator hiperpolarizante derivado do endotélio
EDRF	– fator de relaxamento derivado do endotélio
eNOS	– óxido nítrico sintase endotelial
FAD	– dinucleotídeo de flavina e adenina
FMN	– mononucleotídeo de flavina
GCs	– guanilato ciclase solúvel
GMPc	– monofosfato cíclico de guanosina
GTP	– trifosfato de guanosina
IFN- γ	– interferon- γ
IL-1 β	– interleucina 1 β
iNOS	– óxido nítrico sintase induzida
K _{ATP}	– canal de potássio sensível ao ATP
K _V	– canal de potássio voltagem-dependente
K _{Ca}	– canal de potássio ativado por cálcio
LPS	– lipopolissacarídeo
NADPH	– nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)
NAP	– N-acetil-DL-penicilamina
NO	– óxido nítrico
NO ₂ ⁻	– nitrito
NO ₃ ⁻	– nitrato
Nnos	– óxido nítrico sintase neuronal
NOS	– óxido nítrico sintase
PAM	– pressão arterial média
RSNO	– grupamento nitrosotiol
SNP	– nitroprussiato de sódio
SNAP	– S-nitroso-N-acetil-DL-penicilamina
TEA	– tetraetilamônio
TNF- α	– fator de necrose tumoral- α

LISTA DE FIGURAS

1	Painel fotográfico ilustrando os procedimentos adotados para o registro direto da pressão arterial de ratos anestesiados.....	42
2	Hiporresponsividade vascular à fenilefrina em ratos pré-tratados com LPS.....	52
3	Potencialização dos efeitos vasodilatadores da bradicinina em ratos pré-tratados com LPS.....	53
4	Registro típico da pressão arterial média de um rato anestesiado, mostrando a redução dos efeitos vasoconstritores da fenilefrina após a infusão de nitroprussiato de sódio.....	55
5	Efeitos da infusão de nitroprussiato de sódio ou S-nitroso-acetil-DL-penicilamina sobre a ação vasoconstritora da fenilefrina e da angiotensina I em ratos anestesiados.....	58
6	Efeitos da infusão de nitroprussiato de sódio ou S-nitroso-acetil-DL-penicilamina sobre a ação vasodilatadora da bradicinina e da acetilcolina em ratos anestesiados.....	59
7	Efeitos da infusão de nitroprussiato de sódio sobre a ação vasodilatadora do próprio nitroprussiato de sódio e do iloprost em ratos anestesiados.....	60
8	Responsividade vascular à fenilefrina e à bradicinina em ratos anestesiados, 24 horas após a infusão de nitroprussiato de sódio.....	61
9	Efeitos da administração dos bloqueadores de canais de potássio, antes da infusão de nitroprussiato de sódio, sobre a responsividade vascular à fenilefrina e à bradicinina em ratos anestesiados.....	66
10	Efeitos da administração de bloqueadores de canais de	

potássio, após a infusão de nitroprussiato de sódio, sobre a responsividade vascular à fenilefrina e à bradicinina em ratos anestesiados.....	67
11 Influência da administração de tetraetilamônio sobre os efeitos vasoconstritores da fenilefrina em ratos anestesiados, 24 horas após a infusão de SNP.....	68
12 Modelo proposto para os possíveis mecanismos envolvidos nas alterações da responsividade vascular a vasoconstritores e a vasodilatadores induzidas pela infusão de doadores de óxido nítrico	83

Resumo

O choque séptico é um estado de perfusão tecidual inadequada induzido por produtos microbianos, caracterizado por baixa na pressão sanguínea, sinais bioquímicos de déficit de oxigênio, danos vasculares, hiporreatividade a vasoconstritores e coagulação intravascular disseminada, que pode conduzir à disfunção múltipla de órgãos e à morte. O objetivo deste estudo foi avaliar a relação entre a excessiva produção de NO e as respostas vasculares a substâncias vasoativas, do ponto de vista hemodinâmico. Considerando-se que o LPS induz a liberação de um vasto número de mediadores e que muitos deles têm efeitos cardiovasculares, o uso de endotoxinas em modelos de choque séptico pode ser, algumas vezes, um meio inadequado ou limitado para o estudo de um único mediador envolvido nesta patologia. Portanto, para o estudo dos efeitos do óxido nítrico (NO) sobre as respostas vasculares a vasoconstritores e a vasodilatadores, desenvolvemos um modelo experimental que consiste na infusão de doadores de NO. Nós investigamos os efeitos da exposição do sistema vascular de ratos ao NO, usando a infusão de nitroprussiato de sódio (SNP) ou S-nitroso-acetil-DL-penicilamina (SNAP), dois doadores de NO, sobre as respostas da pressão arterial média (PAM) para substâncias vasoconstritoras (fenilefrina, angiotensinas I e II) e vasodilatadoras (bradicinina, acetilcolina, SNP e iloprost). SNP (250 nmol/kg/min) ou SNAP (250 nmol/kg/min), infundidos durante 30 min, diminuíram a PAM para valores entre 40 e 60 mmHg. A PAM retornou para valores normais em aproximadamente 5 a 10 min após o término da infusão dos doadores de NO. Após a infusão de SNP ou SNAP, os efeitos da fenilefrina, angiotensina I e angiotensina II foram reduzidos em 40-80%, enquanto as respostas para a bradicinina e para a acetilcolina foram

potencializadas em 50-80%. Estas alterações na responsividade vascular persistiram por pelo menos 24 h após a infusão de SNP, similar ao que acontece em animais tratados com LPS. O pré-tratamento com tetraetilamônio (360 $\mu\text{mol/kg}$) ou 4-aminopiridina (1 $\mu\text{mol/kg}$) não alterou os efeitos da fenilefrina ou da bradicinina em animais controle, mas preveniu as alterações na responsividade vascular à fenilefrina e à bradicinina, induzidas pela infusão de SNP. Por outro lado, a administração de tetraetilamônio, até 24 h após a infusão de SNP, reverteu a hiporresponsividade à fenilefrina, enquanto a 4-aminopiridina foi inefetiva. Quando utilizadas após a infusão de SNP, tanto o tetraetilamônio como a 4-aminopiridina não alteraram a potencialização às maiores doses de bradicinina. A utilização de glibenclamida não alterou os parâmetros avaliados. Estes resultados indicam que as alterações induzidas pelo NO na responsividade vascular a vasoconstritores e a vasodilatadores são muito mais profundas e duradouras do que previamente descrito, e que estes efeitos parecem ser, ao menos em parte, mediados pela ativação persistente de uma subpopulação de canais de potássio sensíveis ao tetraetilamônio.

Abstract

Septic shock is a state of inadequate tissue perfusion induced by microbial products, which is characterized by low blood pressure and biochemical signals of oxygen deficit, accompanied by vascular damage, hyporeactivity to vasoconstrictors and disseminated intravascular coagulation, leading to multiple organ dysfunction and death. In the current study we have attempted to evaluate the relationship between excessive NO production and responses to vasoactive compounds from a haemodynamic standpoint. Considering that LPS releases a vast number of mediators and that several of them have cardiovascular effects, the use of endotoxin injection as a model for septic shock would seem a somewhat inadequate or limited approach to pinpoint the roles of any single mediator. Therefore, we have developed a model for studying the role of nitric oxide (NO) on the vascular responses to vasoconstrictors and vasodilators, namely the infusion of NO donors. We investigated the effects of the exposure of the rat vascular system to NO, using either infusion of NO donors sodium nitroprusside (SNP) or S-nitroso-acetyl-DL-penicillamine (SNAP), on mean arterial pressure (MAP) responses to vasoconstrictors (phenylephrine, angiotensins I and II) and to vasodilators (bradykinin, acetylcholine, SNP and iloprost). SNP (250 nmol/kg min) or SNAP (85 nmol/kg/min) infused for 30 min decreased MAP by 40-60 mmHg. MAP returned to normal levels 5-10 min after the end of infusion. Following infusion of SNP or SNAP the effects of phenylephrine, angiotensin I and angiotensin II were reduced by 40-80%, while the responses to bradykinin or acetylcholine were enhanced by 50-80%. These changes in vascular responsiveness persisted for at least 24 h after the

SNP-infusion, being similar to that seen in LPS-treated animals. Pretreatment with either tetraethylammonium (360 $\mu\text{mol/kg}$) or 4-aminopyridine (1 $\mu\text{mol/kg}$) did not alter the effects of phenylephrine or bradykinin in control animals, but prevented SNP-induced changes in responsiveness to phenylephrine or bradykinin. On the other hand, administration of tetraethylammonium, even 24 h after SNP infusion reversed hyporesponsiveness to phenylephrine, whereas 4-aminopyridine was ineffective. Tetraethylammonium and 4-aminopyridine did not alter the increased responses to higher doses of bradykinin (10 and 30 $\mu\text{mol/kg}$). Glibenclamide was without effect in any situation. These results indicate that NO-induced changes on vascular responsiveness to vasoconstrictors and vasodilators are much more profound and long-lasting than previously described, and that its effects appear to be, at least in part, mediated by persistent activation of a tetraethylammonium-sensitive population of K^+ channels.

SUMÁRIO

Lista de Tabelas.....	i
Lista de Abreviaturas.....	ii
Lista de Figuras.....	iii
Resumo.....	v
Abstract.....	vii
I – Introdução.....	1
1.1 Considerações gerais sobre o choque séptico.....	1
1.2 O choque séptico e a falência múltipla de órgãos.....	3
1.3 Mediadores envolvidos na patogênese do choque séptico.....	4
1.4 Papel da bradicinina no choque séptico – relevância do sistema de contato de coagulação.....	7
1.5 Sintomas cardiovasculares do choque séptico: da hipotensão às alterações na responsividade vascular	9
1.6 Importância biológica do óxido nítrico: do histórico à participação no choque séptico.....	12
1.6.1 Descoberta e caracterização do óxido nítrico.....	12
1.6.2 Produção de óxido nítrico por sistemas orgânicos.....	16
1.6.3 Alvos moleculares do óxido nítrico.....	21
1.6.4 Aspectos fisiopatológicos do óxido nítrico: envolvimento no choque séptico.....	24
1.7 Importância dos canais de potássio na função vascular: modulação pelo óxido nítrico e outras substâncias derivadas do endotélio.....	31
II – Objetivos.....	38
III – Material e Métodos.....	39
3.1 Animais utilizados.....	39
3.2 Procedimentos cirúrgicos.....	39

3.3	Protocolo experimental.....	41
3.3.1	Indução do choque endotoxêmico.....	41
3.3.2	Infusão dos doadores de NO.....	43
3.3.3	Tratamento com bloqueadores de canais de K ⁺	45
3.3.4	Ensaio para determinação de NO _x	46
3.4	Drogas.....	47
3.5	Análise estatística.....	47
IV	– Resultados.....	49
4.1	Efeitos da administração de LPS.....	49
4.2	Efeitos da infusão de doadores de NO.....	54
4.3	Efeitos dos bloqueadores de canais de potássio.....	62
V	– Discussão.....	69
VI	– Considerações Finais.....	84
VII	– Conclusões.....	86
VII	– Referências Bibliográficas.....	89

I – Introdução

1.1 Considerações gerais sobre o choque séptico

O choque séptico é uma síndrome de elevada incidência em ambientes hospitalares, especialmente em unidades ou clínicas responsáveis por procedimentos cirúrgicos, tratamento de doenças infecto-contagiosas e atendimento a politraumatizados, sendo responsável por um alto índice de mortalidade em unidades de terapia intensiva. Ao longo das últimas décadas, a evolução da medicina propiciou um aumento na perspectiva de vida de idosos e de pacientes com enfermidades graves, o que associado aos crescentes índices de acidentes diversos, ao emprego descontrolado da antibioticoterapia e à elevada frequência de infecções hospitalares, têm contribuído, direta e indiretamente, para o constante aparecimento de novos casos de choque séptico.

Surpreendentemente, a elevada incidência deste quadro patológico não é restrita a países subdesenvolvidos ou emergentes como o Brasil. Estima-se que a cada ano surjam aproximadamente 500.000 novos casos de choque séptico nos Estados Unidos e cerca de 75.000 casos na Alemanha (Wenzel *et al.*, 1996), índices equivalentes, se consideradas as populações totais de cada um destes países.

Com baixos índices de sobrevivência — geralmente menores que 50% (Baker *et al.*, 1980; Beal & Cerra, 1994; Manship *et al.*, 1984; Pine *et al.*, 1983) — o choque séptico é consequência da invasão da corrente sanguínea por agentes microbianos, geralmente bactérias gram-negativas, embora bactérias gram-positivas e fungos também possam desenvolver papéis centrais na gênese deste quadro. O choque

séptico geralmente envolve pelo menos dois estágios distintos de evolução. Uma fase inicial, na qual ocorre uma exacerbação da atividade cardiovascular (denominada hiperdinâmica circulatória), caracterizada por elevação do débito cardíaco e redução da resistência periférica (Parrillo, 1993), a princípio acompanhados de um aumento na frequência cardíaca. Embora muitos pacientes acabem morrendo nos estágios iniciais da doença, em um grande número de casos estas alterações hemodinâmicas evoluem, gradualmente, para um estado hipodinâmico (estágio tardio do choque), devido, em grande parte, à redução gradativa da performance cardíaca. A absoluta maioria dos casos de recuperação de um choque séptico acontece com pacientes que não adentraram nos estágios tardios da doença, quando o êxito letal torna-se iminente. A *causa mortis* geralmente é um estado de vasodilatação irreversível combinada com falência do miocárdio, algumas vezes acompanhada de uma arritmia terminal (Mercier *et al.*, 1988; Brandtzaeg, 1996a).

Clinicamente diagnosticado pela presença de hipotensão associada a sinais como alterações no estado de vigília, diminuição do débito urinário, redução da perfusão tecidual, danos vasculares, hiporresponsividade a agentes vasoconstritores, taquipnéia, sinais bioquímicos de déficit de oxigênio, aumento dos níveis plasmáticos de lactato, hiperglicemia, elevada produção de uréia e coagulação intravascular disseminada, o choque séptico pode conduzir a graves disfunções em sistemas orgânicos, na maioria das vezes seguida da falência de órgãos vitais, como os rins, os pulmões, o fígado e o baço, dentre outros.

A demonstração prática da correlação entre níveis plasmáticos de lipopolissacarídeo de membrana (LPS) e a gravidade clínica do choque séptico

(Levin *et al.*, 1970, *apud* Brandtzaeg, 1996a) estimulou inúmeros estudos acerca desta patologia, nos quais uma síndrome muito semelhante ao choque séptico é induzida através da administração de LPS, tanto em animais de laboratório como em humanos (Parrat, 1973; Suffredini *et al.*, 1989).

1.2 O choque séptico e a falência múltipla de órgãos

Descrita pela primeira vez entre os anos de 1965 e 1970, quando surgiram inúmeros trabalhos descrevendo a falência precoce de diferentes órgãos como uma grave complicação do choque séptico (Clowes *et al.*, 1968; Skillman *et al.*, 1969; *apud* Thijs *et al.*, 1996), a falência múltipla, progressiva e sequencial dos sistemas orgânicos é, em última análise, a responsável pelo grande índice de mortalidade entre pacientes sépticos. Estima-se que a mortalidade entre pacientes que apresentam falência múltipla de órgãos varia entre 30 e 100%, dependendo do número de sistemas orgânicos atingidos, da faixa de idade dos pacientes, da presença de doenças preexistentes e da duração da falência orgânica (Knaus *et al.*, 1985).

Usualmente definida como a falência de pelo menos dois sistemas orgânicos, que tornam-se incapazes de manter a homeostasia, a falência múltipla de órgãos vem sendo classificada como uma síndrome, e a denominação de “síndrome de disfunção de múltiplos órgãos” tem sido defendida como uma descrição mais apropriada para a mesma (Thijs *et al.*, 1996). Embora não exista um consenso definitivo quanto aos eventos que efetivamente levam à falência dos sistemas orgânicos e tão pouco acerca de critérios para a classificação de diferentes graus de disfunção orgânica, os sistemas respiratório, renal, gastrointestinal, hepático,

hematológico, cardiovascular e o sistema nervoso central estão incluídos na definição de disfunções orgânicas em uma considerável parcela de trabalhos científicos sobre o assunto (Thijs *et al.*, 1996). Recentemente, uma aplicação prática mais abrangente tem sido sugerida para a síndrome de disfunção de múltiplos órgãos, a qual além de ser considerada uma disfunção progressiva, mas potencialmente reversível, pode ser induzida por uma variedade de problemas agudos decorrentes de diversas condições adversas, como insuficiência cardíaca, choque hipovolêmico e intervalo de tempo antes de uma adequada ressuscitação cardio-respiratória, além do próprio choque séptico (Bone *et al.*, 1992). Entretanto, pacientes com choque séptico continuam sendo considerados muito mais susceptíveis ao desenvolvimento de disfunções orgânicas múltiplas (Knaus *et al.*, 1985).

1.3 Mediadores envolvidos na patogênese do choque séptico

Um grande número de mediadores humorais e produtos liberados por várias células estão envolvidos nos eventos imunológicos existentes no choque séptico. Alguns deles têm sido responsabilizados por grande parte dos sintomas clínicos da sepsis e das mais severas formas de choque séptico (Thijs *et al.*, 1996). Neste grupo de substâncias incluem-se as citocinas pró-inflamatórias (como o fator de necrose tumoral α e β e uma vasta lista de interleucinas), o sistema complemento e as vias extrínsecas e de contato dos sistemas fibrinolítico e de coagulação. Além disso muitos elementos celulares, como células mononucleares, neutrófilos, células endoteliais e plaquetas desempenham papéis de destaque no desenvolvimento desta síndrome, através da liberação de uma ampla gama de substâncias bioativas,

tais como prostaglandinas, leucotrienos, fator de ativação plaquetária, endotelinas, radicais livres de oxigênio, proteinases e óxido nítrico. Os efeitos biológicos destes sistemas de mediadores são diversos e complexos. Eles podem induzir a liberação de outros mediadores (e algumas vezes deles próprios), apresentar efeitos sinérgicos, manifestar efeitos diferentes quando em combinação e através destas interações, aumentar ou limitar o processo inflamatório (para revisão ver Thijs *et al.*, 1996).

Dentre as citocinas pró-inflamatórias liberadas por células do sistema imune, como macrófagos, linfócitos e monócitos, o TNF- α e a IL-1 β são considerados os mediadores mais importantes da resposta inflamatória generalizada do choque séptico (Parker, 1998). Os efeitos biológicos das citocinas geralmente decorrem da ação em conjunto destas substâncias, sendo que apenas o TNF- α apresenta atividade quando utilizado isoladamente (ver Roitt *et al.*, 1992). Estas citocinas, em especial o TNF- α , exercem efeitos tóxicos diretos sobre as células endoteliais, além de aumentarem a permeabilidade vascular (Martin *et al.*, 1988; Schuger *et al.*, 1989; Robaye *et al.*, 1991). Enquanto pacientes com choque séptico não apresentam níveis circulantes detectáveis de IL1- β — que por esta razão é considerada uma citocina inflamatória local de ação primária (Brandtzaeg, 1996a) — em humanos, a injeção de pequenas quantidades de LPS aumenta significativamente a concentração plasmática de TNF- α (Michie *et al.*, 1988). Grandes quantidades de TNF- α fazem com que as células endoteliais percam suas propriedades anticoagulantes naturais, aumentando a taxa de deposição de fibrina. Isto pode resultar em coagulação intravascular disseminada, podendo o plasma ficar desprovido de fatores de coagulação. Em sobreposição a estes eventos, como o

TNF- α também tem importante atividade sobre os neutrófilos, ele promove a aderência de células polimorfonucleares ao endotélio e as faz sofrer degranulação e formar compostos intermediários do oxigênio, tais como o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio, moléculas altamente reativas. O TNF- α aumenta também a produção de radicais livres de oxigênio e a atividade citotóxica dos macrófagos (células do sistema imune responsáveis pela sua liberação), além de induzir a liberação de outras citocinas, como a IL-1, a IL-6 e a IL-8, do fator de agregação plaquetária e da prostaglandina E₂ (De Forge *et al.*, 1990; Rock & Lowry, 1991). Diversas evidências obtidas *in vivo* denotam um importante e nocivo papel do TNF- α no choque séptico. A utilização de anticorpos monoclonais contra TNF- α é capaz de reduzir a morte e a falência circulatória causada pelo choque séptico em ratos (Tracey *et al.*, 1987; Nassif *et al.*, 1992; Ruetten & Thiemermann, 1997), ao passo que a injeção de TNF- α recombinante puro é capaz de mimetizar alguns sintomas do choque séptico (Tracey *et al.*, 1986; Takahashi *et al.*, 1992). Além disso, TNF- α foi facilmente detectado no fluido cefalorraquidiano de pacientes com septicemia grave induzida por *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenza*, *Streptococcus pneumoniae* e outras bactérias purulentas (Glimaker *et al.*, 1993).

Por outro lado, os efeitos biológicos das citocinas pró-inflamatórias são balanceados por diversas citocinas anti-inflamatórias, das quais destacam-se a IL-10, a IL-4 e o fator de crescimento e transformação- β (TGF- β). Destas, a IL-10 — que elimina a capacidade do TNF- α , da IL-6 e da IL-8 de ativar monócitos obtidos de doadores humanos (Brandtzaeg, 1996b) — foi detectada em pacientes com choque séptico induzido por bactérias gram-positivas e gram-negativas e em crianças com septicemia meningocócica (Marchant *et al.*, 1994; Derkx *et al.*, 1995). Como a IL-10

é encontrada nos estágios iniciais do choque séptico em níveis de 10-100 vezes maiores do que as outras cininas antiinflamatórias conhecidas, ela vem sendo considerada uma das mais importantes cininas antiinflamatórias (para revisão, ver Brandtzaeg, 1996a).

Sabe-se que o choque séptico é geralmente precedido de uma infecção local não controlada, na qual bactérias ou produtos bacterianos ganham acesso à circulação sanguínea sistêmica e induzem uma resposta inflamatória exacerbada. Como bactérias e seus produtos causam danos teciduais, o objetivo de uma imunomodulação eficaz seria aumentar as respostas imunes ao agente agressor. Entretanto, embora existam inúmeros mecanismos responsáveis pelo balanceamento do processo imunológico (alguns dos quais foram abordados acima), estes parecem ser ineficientes durante o choque séptico, no qual uma reação inflamatória descontrolada, que também culmina em danos teciduais (Thijs *et al.*, 1996), é uma das responsáveis pela elevada letalidade deste quadro patológico.

1.4 Papel da bradicinina no choque séptico — relevância do sistema de contato de coagulação

Lesões teciduais e estímulos inflamatórios podem desencadear a ativação de calicreínas teciduais e plasmáticas, resultando na formação de cininas biologicamente ativas (Regoli & Barabé, 1980). Durante o choque séptico as taxas de coagulação sanguínea estão aumentadas e o sistema cinina-calicreína ativado (DeLa Cadena *et al.*, 1993; Fink, 1998). A ativação do sistema de contato de coagulação, fator XII (fator de Hageman), dá origem ao fator XIIa (fator de Hageman ativado). Este fator, além de estimular a ativação de toda a cascata de fatores que

induz a coagulação sanguínea, também ativa a pré-caliceína plasmática, formando a caliceína plasmática, responsável pela formação de bradicinina, a partir da hidrólise do cininogênio de alto peso molecular (para revisão ver Bhoola *et al.*, 1992). A ativação de produtos do sistema de contato de coagulação tem importantes efeitos biológicos, como aumento da permeabilidade vascular, diminuição do tônus dos vasos e agregação e degranulação de neutrófilos. Tais efeitos são, ao menos em parte, consequência da geração de bradicinina, um nonapeptídeo considerado um dos mais potentes vasodilatadores endógenos, que pode ter um importante papel na queda da pressão arterial existente durante o choque séptico. De fato, a utilização de anticorpos monoclonais contra o fator XII é capaz de reverter a hipotensão irreversível existente durante o choque séptico, e esta atividade vem sendo atribuída à menor formação de bradicinina (Pixley *et al.*, 1993).

Considerada uma das mais importantes cininas conhecidas, a bradicinina apresenta uma série de propriedades farmacológicas. Como um potente mediador parácrino, a bradicinina está envolvida em processos patológicos e fisiológicos, incluindo contração de músculo liso não-vascular, vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e indução de dor (Proud & Kaplan, 1988).

Dois subtipos de receptores para a bradicinina, denominados receptores B₁ e B₂, foram identificados e caracterizados farmacologicamente. A clonagem dos receptores bradicinérgicos B₁ e B₂ mostrou que estes podem estar acoplados a pelo menos três diferentes tipos de proteínas G, dependendo do tipo celular e sistemas efetores envolvidos (Liao & Homcy, 1993). Na maioria dos mamíferos, inclusive no homem, o subtipo B₁ é encontrado somente em circunstâncias onde há lesão tecidual prévia ou presença de fatores inflamatórios, como citocinas e

lipopolissacarídeos, sendo por isso caracterizado como um receptor do tipo induzido (Regoli *et al.*, 1981). Já os receptores do tipo B₂ são expressos constitutivamente em diferentes tecidos, incluindo células musculares lisas, neurônios e fibroblastos, entre muitas outras, sendo que a ativação deste receptor pode causar, por exemplo, hipotensão pronunciada (para revisão ver Marceau, 1995). A bradicinina interage fracamente com os receptores B₁, mas é um agonista potente de receptores B₂. No entanto, o principal agonista dos receptores B₁ é a des-arg⁹-bradicinina, produto da degradação da bradicinina pela enzima cininase I, uma carboxipeptidase (Marceau *et al.*, 1981).

Embora tenha sido demonstrado que a modulação do sistema de coagulação protege animais de laboratório contra lesões teciduais e efeitos letais de uma sepsis experimental (Taylor *et al.*, 1988), a importância da bradicinina no desenvolvimento das alterações cardiovasculares existentes no choque séptico permanece controversa.

1.5 Sintomas cardiovasculares do choque séptico: da hipotensão às alterações na responsividade vascular

A exemplo do que acontece com os mais importantes sistemas orgânicos, o sistema cardiovascular tem sua homeostasia alterada em todas as etapas do choque séptico. Detentor da função primária de manter a circulação sanguínea, que compreende o transporte de oxigênio e nutrientes para os tecidos e o transporte de dióxido de carbono e metabólitos para os órgãos de excreção (pulmões e rins, primordialmente), a regulação da funcionalidade deste sistema ocorre, em última instância, de acordo com a demanda metabólica dos tecidos e depende,

primariamente, da ação propulsora do coração.

Em linhas gerais, durante a sepsis, a manutenção da oxigenação celular é alterada, principalmente, em virtude dos seguintes fenômenos: i) aumento da demanda tecidual de oxigênio devido ao aumento do metabolismo celular; ii) deficiência na utilização do oxigênio circulante devido a alterações na funcionalidade microvascular periférica e iii) redução no transporte de oxigênio, resultante da manifestação de depressão da função miocárdica (Vincent, 1998). Desta forma, o aumento na atividade cardiovascular que ocorre nas fases iniciais da sepsis e do choque séptico, denominada fase hiperdinâmica do choque, pode ser explicada como decorrente do aumento no metabolismo celular, com conseqüente aumento na produção de metabólitos e maior necessidade de oxigênio por parte dos tecidos, além de possíveis efeitos diretos de mediadores sobre o sistema cardiovascular.

A fase inicial de hiperdinâmica circulatória, entretanto, não prevalece no choque séptico. A atividade cardiocirculatória diminui rapidamente, criando um quadro secundário conhecido como fase de hipodinâmica circulatória, caracterizada pelo colapso da atividade cardiovascular, decorrente da hipotensão progressiva, hiporreatividade a agentes vasoconstritores e falência circulatória, com sinais de hipoperfusão tecidual. Embora um aumento no débito cardíaco seja usual, evidências como a diminuição na fração de ejeção ventricular direita (Zellner *et al.*, 1991) e responsividade reduzida à administração de fluidos, sugerem que a atividade miocárdica é deprimida e o ventrículo esquerdo dilatado durante o choque séptico, condições totalmente reversíveis em pacientes que sobrevivem a esta patologia (Parrillo *et al.*, 1990).

Aparentemente, o coração é um dos alvos primários de inúmeros mediadores

envolvidos no choque séptico (Vincent *et al.*, 1981; Abel, 1989; *et al.*, 1991; Vincent *et al.*, 1992), podendo ser responsável por grande parte das alterações cardiovasculares associadas ao choque séptico (Raymond, 1990), ao menos nas fases iniciais deste quadro. Por outro lado, a existência de depressão miocárdica durante as fases iniciais da sepsis e do choque séptico é pouco evidente para diversos autores (por exemplo, Krosi *et al.*, 1994). As causas da depressão do miocárdio durante a sepsis têm sido amplamente debatidas, e eventos como a isquemia, formação de edema e liberação de substâncias depressoras do miocárdio vêm sendo sugeridos como desencadeantes deste fenômeno. Entretanto, nenhuma destas hipóteses foi comprovada ou fortalecida experimentalmente (para revisão ver Vincent, 1998).

A diminuição no tônus vascular, a exemplo de inúmeros outros sintomas do choque séptico, foi e é objeto de intensos estudos. Ao longo dos anos este sintoma tem sido considerado resultante dos efeitos de diversos mediadores liberados em maior quantidade durante a sepsis, tais como o óxido nítrico, a histamina, cininas, prostaglandinas e citocinas, como o próprio TNF e a IL-1, em diversos modelos experimentais. Entretanto, uma maior liberação de substâncias vasoconstritoras, como o tromboxano e endotelinas durante a sepsis tem sido demonstrada, o que sugere que o grau de alteração no tônus vascular durante o choque séptico resulta de um desequilíbrio entre influências vasodilatadoras e vasoconstritoras, mais do que um simples aumento na liberação de substâncias vasodilatadoras (Vincent, 1998).

Como fator agravante, a diminuição do tônus vascular e conseqüente hipotensão existente durante o choque séptico não é sensível a agentes

vasoconstritores clássicos, como agonistas α_1 -adrenérgicos (Pomerantz *et al.*, 1982; McKenna *et al.*, 1986), o que cria a clássica condição de hiporresponsividade a vasoconstritores. Curiosamente, este fenômeno parece iniciar-se em estágios precoces do choque séptico, mas não se sabe ao certo se ele é uma das principais causas, ou uma consequência, da hipotensão e de eventos que conduzem à falência múltipla de órgãos existentes nas fases finais do choque séptico. Além disso, os eventos celulares envolvidos na hiporeatividade do músculo liso vascular a agentes vasoconstritores durante o choque séptico permanecem mal esclarecidos (Kilbourn *et al.*, 1997).

1.6 Importância biológica do óxido nítrico: do histórico à participação no choque séptico

1.6.1 Descoberta e caracterização do óxido nítrico

O óxido nítrico (NO), um gás que em grandes quantidades é um componente tóxico que polui o ar, tem sido muito estudado por ser produzido enzimaticamente de maneira regulada em um grande número de tecidos e tipos celulares.

A produção de óxidos de nitrogênio por mamíferos foi sugerida pela primeira vez no ano de 1916 por Mitchell *et al.*, mas esta observação foi ignorada até o final da década de 1970 e início dos anos de 1980, quando, estudando a importância da formação de nitrato endógeno durante a carcinogênese, Green *et al.* (1981a) confirmaram que mamíferos produziam nitrato (NO₃⁻). Embora inicialmente pouca importância tenha sido dada a este achado, pois presumia-se que o nitrato encontrado na urina humana derivava de nitrosaminas (compostos inorgânicos que também contêm oxigênio e nitrogênio) presentes na alimentação, a demonstração

de que esta produção (de nitrato) era aumentada durante infecções em humanos (Green *et al.*, 1981a) e após o tratamento com endotoxina em animais de laboratório (Green *et al.*, 1981b) deu nova ênfase a estas descobertas (para revisão ver Morris & Billiar, 1994).

No mesmo período (final dos anos de 1970), um grupo de pesquisadores liderados por Robert Furchgott verificou, pela primeira vez após anos de trabalho utilizando preparações *in vitro* de aorta de coelho, que a utilização de agonistas muscarínicos nestas preparações era capaz de produzir um potente relaxamento, semelhante à vasodilatação causada por estas drogas *in vivo*. O próprio Furchgott analisou com surpresa estes resultados, pois durante décadas seguidas a utilização de agonistas muscarínicos (como a própria acetilcolina) causava apenas contrações. Ao analisar acuradamente seus resultados, ele constatou que as diferenças estavam na forma como a aorta era retirada dos coelhos. Durante anos ele utilizou tiras helicoidais de aorta de coelho em seus experimentos, preparação que foi introduzida em 1953 como ferramenta para o estudo farmacológico de substâncias vasoativas e interações droga-receptor. Já nos experimentos em que ele obteve relaxamento induzido pela acetilcolina, a aorta de coelho era isolada na forma de anéis, de maneira muito mais cuidadosa do que as preparações em forma de tira. Além disso, para complicar ainda mais esta questão, nem todas as preparações isoladas na forma de anel respondiam com relaxamento quando em presença de acetilcolina. Então, a mais importante conclusão a que chegou Furchgott, nesta fase de seus experimentos, foi que o relaxamento em resposta à acetilcolina nestas preparações dependia do cuidado com que os anéis eram isolados. Ele percebeu que quando a parte interna ou luz dos vasos eram friccionadas, como acontecia com as

preparações helicoidais, o relaxamento à acetilcolina era eliminado. Por outro lado, quando a íntima do vaso era preservada, todas as preparações respondiam à acetilcolina com relaxamento. Ao analisar as preparações que não respondiam à acetilcolina com relaxamento, percebeu-se que o endotélio encontrava-se removido das mesmas. Algum tempo depois, o próprio Furchgott demonstrou que o endotélio, estimulado por diferentes agonistas e em diferentes espécies, liberava uma substância (ou substâncias) lábil, de fácil difusão, não prostanóide, que agia sobre as células do músculo liso dos vasos sanguíneos de diferentes tecidos e espécies, causando relaxamento (Furchgott & Zawadzki, 1980; para uma revisão detalhada ver Furchgott, 1993 e Furchgott, 1996).

A denominação fator relaxante derivado do endotélio (FRDE, ou EDRF, para o termo em inglês *endothelium-derived relaxing factor*), entretanto, foi utilizada pela primeira vez apenas em 1983, quando Cherry *et al.*, do mesmo grupo de Furchgott, assim denominou a substância (ou substâncias) responsável pelo relaxamento induzido pela bradicinina em artérias humanas e de cães. Enquanto a identidade do EDRF permanecia desconhecida, Stuehr & Marletta (1985) demonstraram que macrófagos de camundongos produziam nitrato e nitrito (NO₂⁻) em resposta ao tratamento com LPS, ilustrando pela primeira vez a produção de óxidos de nitrogênio por uma célula específica de mamíferos. Certamente, uma das mais importantes contribuições sobre os mecanismos envolvidos na atividade citotóxica de macrófagos advém deste período, quando Hibbs *et al.* (1987) relataram que i) a L-arginina era o substrato utilizado por macrófagos de camundongos na produção de NO₂⁻ e NO₃⁻; ii) a conversão de L-arginina para NO₂⁻ e NO₃⁻ era necessária para a citotoxicidade de macrófagos contra certas linhagens de células tumorais e iii) que

análogos da L-arginina eram eficientes inibidores competitivos desta via.

Finalmente, também em 1987, a descoberta do NO como mediador endógeno, e mais ainda, sua identidade com o EDRF, por Palmer, Ferrige & Moncada, pôs fim a uma dúvida que tumultuou o meio científico durante praticamente uma década. Este achado foi confirmado pouco depois por Ignarro *et al.* (1987).

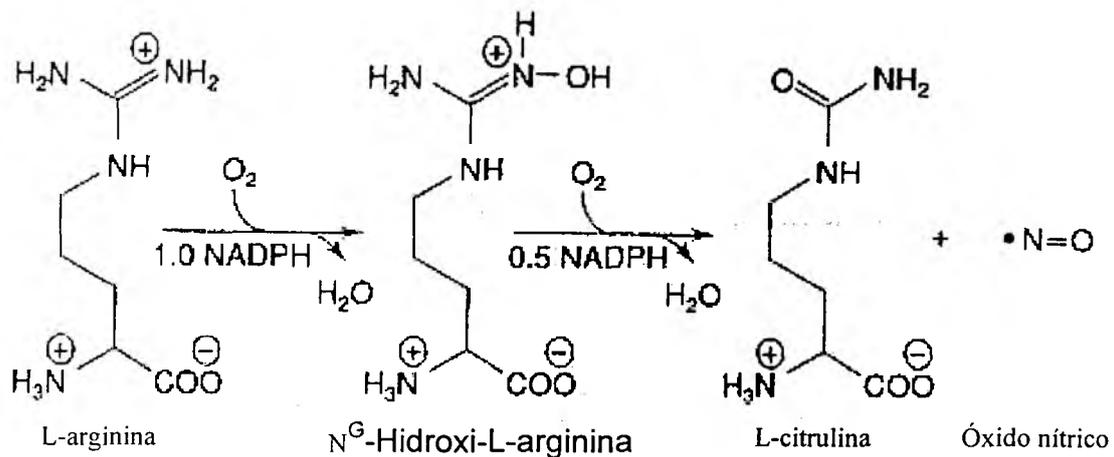
No ano seguinte Palmer *et al.* (1988), mostraram que a L-arginina era o substrato para a formação de NO pelas células endoteliais. Como era conhecido que o NO apresentava uma meia vida curta (variando de 1 a 3 segundos, em condições fisiológicas; Vaughn *et al.*, 1998) e rapidamente decaía a NO₂⁻ e NO₃⁻, não foi difícil para estes autores reportarem que o NO era o intermediário biologicamente ativo da via de formação de NO₂⁻ e NO₃⁻ a partir da L-arginina, o que foi confirmado posteriormente em macrófagos por diferentes pesquisadores (Marletta *et al.*, 1988; Hibbs *et al.*, 1988; Stuehr *et al.*, 1989a). Além disso, análogos da L-arginina já eram reconhecidos inibidores da via de formação de NO₂⁻ e NO₃⁻, e rapidamente tornaram-se ferramentas úteis para o estudo dos efeitos fisiológicos e patofisiológicos do NO (para revisão ver Quinn *et al.*, 1995).

Desde então, a via L-arginina-óxido nítrico tem sido relacionada à diversos processos biológicos em quase todos os sistemas orgânicos, como o sistema nervoso, endócrino, imune e cardiovascular. Produzido em quantidade e período apropriados, o NO atua como uma molécula sinalizadora essencial em diversos processos fisiológicos, como neurotransmissão, aprendizagem, memória e regulação do tônus vascular. Com um peso molecular igual a 30, o NO é certamente uma das menores moléculas envolvidas em processos de mediação celular. Embora não seja

um mediador intercelular clássico (do tipo que se liga a receptores de membrana), o NO é uma molécula que se difunde livremente e tem seus efeitos biológicos determinados pela sua reatividade química; como um radical livre, ele reage rapidamente com espécies contendo elétrons não pareados, como oxigênio molecular, ânion superóxido (O₂⁻) e metais (Mayer & Hemmens, 1997). A complexa interação que ocorre entre o NO e o radical O₂⁻, por exemplo, pode gerar o ânion peroxinitrito (ONOO⁻), o qual, por ser muito instável e gerar espécies semelhantes a radicais hidroxil, desenvolve um importante papel como mediador do estresse oxidativo em diversos estados patológicos (Daloz *et al.*, 1997).

1.6.2 Produção de óxido nítrico por sistemas orgânicos

O NO é sintetizado por um grupo de enzimas denominadas NO sintases (NOS). Sua síntese ocorre em duas etapas, iniciando-se pela oxidação da L-arginina, que origina a N^o-hidroxi-L-arginina como um intermediário estável e, na etapa final, gera L-citrulina e NO em quantidade equimolares (ver Esquema 1). Esta complexa reação envolve o NADPH e o oxigênio molecular como co-substratos fundamentais, e diversos co-fatores, como a tetrahidrobiopterina (THB₄), o dinucleotídeo de flavina e adenina (FAD) e o mononucleotídeo de flavina (FMN), além da calmodulina, considerada um ativador alostérico da NOS (para revisão detalhada ver Crane *et al.*, 1997 e Mayer & Hemmens, 1997).



Esquema 1: Etapas bioquímicas envolvidas na biossíntese de óxido nítrico pela óxido nítrico sintase (Mayer & Hemmens, *Trends Biochem. Sci.*, 22, 477-481, 1997).

As NOS, encontradas em forma de dímeros quando ativas, são enzimas que contêm um grupamento heme e apresentam uma sequência muito similar (aproximadamente 60% de homologia) à do citocromo P-450 redutase, até então, a única enzima conhecida em mamíferos que apresentava sítios de ligação para o FAD e o FMN (ver Knowles & Moncada, 1994; Griffith & Stuehr, 1995).

São conhecidos três subtipos de NOS, que constituem a família das NOS, classificadas de acordo com sua localização subcelular, sequência de aminoácidos, regulação e papéis funcionais em: NOS endotelial (eNOS; enzima constitutiva inicialmente encontrada em células do endotélio vascular), NOS neuronal (nNOS; enzima constitutiva inicialmente encontrada em células neuronais), e NOS induzida (geralmente expressa em diferentes tipos celulares em resposta a estímulos imunológicos ou inflamatórios). O Quadro 1 ilustra as principais características dos três subtipos de NOS.

Quadro 1: Principais características das óxido nítrico sintases.

Subtipo (massa molecular)	Nome alternativo	Crom*. humano	Características distintas	Localização subcelular	Expressão tecidual
Neuronal (160 kDa)	Tipo I nNOS bNOS	12	Cálcio-dependente Constitutiva Expressão aumentada durante processos inflamatórios	Ligada a proteínas específicas via domínio PDZ do terminal amínico	Cél. neuronais M. esquelético
Induzida (130 kDa)	Tipo II iNOS macNOS	17	Calcio-independente Induzida Expressão induzida por IFN, TNF, LPS	Solúvel?	Macrófagos Hepatócitos Cardiomiócitos
Endotelial (134 kDa)	Tipo III eNOS ecNOS	7	Cálcio-dependente Constitutiva Expressão modulada pelo estresse de cisalhamento	Liga-se ao Golgi e à caveola através de palmitoilação e miristoilação do terminal amínico	Cel. endoteliais Cel. epiteliais Cardiomiócitos

* Cromossoma humano que contém o gene responsável pela expressão da enzima.

ADAPTADO DE Hemms & Mayer, *Meth. Mol. Biol.*, 100: 1-32, 1997

Cada NOS é produto de um gene distinto. Os genes que codificam a NOS humana estão localizados nos cromossomas 12 (para a nNOS), 17 (para a iNOS) e 7 (no caso da eNOS), e são denominados *nos1*, *nos2* e *nos3*, respectivamente (Mayer & Hemmens, 1997). Todas as isoformas da NOS possuem as mesmas características básicas no que concerne aos domínios catalíticos: um terminal carboxil redutase, com um sítio de ligação para FAD, FMN e NADPH, e um terminal amina oxigenase. O domínio oxigenase contém um grupamento heme e o sítio de

ligação para o co-fator THB₄. Já a calmodulina liga-se justaposta ao lado terminal amina, na porção redutase da enzima, próxima ao centro da NOS, praticamente separando os domínios redutase e oxigenase. Cada isoforma da NOS apresenta uma extensão diferente do terminal amínico, o qual não é essencial para a catálise de NO e provavelmente está relacionado à localização intracelular da enzima (para revisão detalhada ver Griffith & Stuehr, 1995).

A obtenção de animais que não expressam cada uma das três isoformas da NOS (animais *knockout*), tem propiciado importantes informações a respeito da importância de cada isoforma e os efeitos da sua deleção em animais intactos (Huang & Fishman, 1996, *apud* Moncada *et al.*, 1997). Por exemplo, camundongos *knockout* para a eNOS apresentam, como esperado, níveis pressóricos muito maiores do que animais normais (Huang *et al.*, 1995; Shesely *et al.*, 1996).

As três NOSs humanas apresentam uma sequência de aminoácidos muito semelhante, com uma homologia de aproximadamente 55% entre elas, e, como predito, a região mais conservada corresponde àquela envolvida diretamente no processo de catálise. Uma alta homologia também é verificada entre todas as NOS encontradas em diferentes espécies (aproximadamente 80-90%). Embora a ativação das três isoformas de NOS dependa da modificação alostérica causada pela ligação com a calmodulina, o que é regulado pela presença de cálcio e formação do complexo cálcio-calmodulina, apenas a eNOS e a nNOS dependem da elevação das concentrações de cálcio intracelular para ligarem-se à calmodulina e, conseqüentemente, tornarem-se ativas. A iNOS, ao contrário, é capaz de ligar-se à calmodulina com alta afinidade, mesmo em presença de baixas concentrações intracelulares de cálcio. Estas características fazem com que a atividade da eNOS e

da nNOS, mas não da iNOS, seja modulada diretamente pelas variações nos níveis intracelulares de cálcio (Moncada *et al.*, 1991; Snyder & Bredt, 1992).

Talvez a diferença mais importante entre as enzimas constitutivas eNOS e nNOS e a enzima induzida iNOS esteja relacionada ao período de produção e à quantidade final de NO gerado por cada uma destas enzimas. Uma vez estimuladas, a eNOS e a nNOS permanecem ativas durante curtos períodos de tempo, gerando apenas quantidades picomolares de NO. Por sua vez, quando expressa, a iNOS libera NO durante longos períodos, produzindo quantidades nanomolares deste gás. Por exemplo, a iNOS induzida no fígado de ratos, em resposta à administração de altas doses de LPS, gera elevadas quantidades de NO, pelo menos até 15 horas após o tratamento com LPS (Knowles *et al.*, 1990).

Por sua vez, a associação das três isoformas da NOS com o endotélio, neurônios e processos de indução é, no entanto, uma classificação simplista. Por exemplo, a eNOS é encontrada não apenas em células do endotélio vascular como também em plaquetas e em certas populações neuronais do cérebro, enquanto a nNOS tem sido igualmente encontrada no epitélio dos brônquios e da traquéia, bem como no músculo esquelético. Além do mais, algumas diferenças tem sido identificadas entre iNOS obtidas de diferentes tecidos das mesmas espécies. Por fim, enquanto a eNOS e a nNOS podem ser induzidas (ou, talvez mais exatamente, ter seus níveis de expressão regulados) em certas situações como durante exercícios crônicos, lesões em nervos ou durante a gravidez (quando a iNOS também é induzida), a iNOS parece estar presente constitutivamente em alguns tecidos, incluindo o epitélio brônquico de humanos, os rins de ratos e alguns tecidos fetais (para revisão ver Moncada *et al.*, 1997; Michel & Feron, 1997; Cooke & Dzau,

1997).

1.6.3 Alvos moleculares do óxido nítrico

Um grande número de ligantes, incluindo hormônios, autacóides, drogas e toxinas, tem o GMP cíclico (GMPc) intracelular como o mediador de seus efeitos biológicos. A produção de GMPc ocorre a partir da atividade de enzimas denominadas guanilato ciclases, que catalisam a conversão de GTP para GMPc. As guanilato ciclases se dividem em duas categorias principais: do tipo solúvel (a única que é ativada pelo NO) e do tipo ligada a membrana. O espectro de eventos fisiológicos regulados pelo GMPc inclui respostas da retina a estímulos luminosos, percepção do olfato, formação de esteróides, transporte iônico nos rins e no intestino, regulação dos transientes intracelulares de cálcio (importante para a agregação plaquetária) e regulação da contratilidade do músculo liso e cardíaco. Além do mais, a produção exacerbada ou a hiper-reatividade ao GMPc tem sido relacionada a situações patológicas, como o choque endotoxêmico e a diarreia secretória, e a hiporreatividade, por sua vez, com a hipertensão (para revisão ver Schmidt *et al.*, 1993).

O NO é considerado o principal modulador endógeno da atividade da guanilato ciclase solúvel (CGs), e sua capacidade de ativar estas enzimas foi demonstrada dois anos antes da descoberta do EDRF (Murad *et al.*, 1978). Além disso, mesmo quando o EDRF não tinha sua identidade definida, a correlação que existia entre aumento nos níveis de GMPc e a vasodilatação induzida por agentes endotélio-independentes, coletivamente denominados "nitrocompostos", possibilitou que Furchgott e colaboradores sugerissem, em 1981, que o acúmulo de GMPc era

também o mecanismo envolvido no relaxamento induzido pelo EDRF (Rees, 1991). A interação precisa entre o NO e a GCs não é completamente conhecida, mas a reação entre o NO e o grupamento heme da enzima, que leva à formação de cinco complexos nitrosil-heme coordenados e altera a configuração de um anel porfirínico, tem sido sugerida como responsável pela indução do estado ativado da enzima, que proporciona a conversão de GTP para GMPc (Ignarro *et al.*, 1982; Ignarro *et al.*, 1984; para revisão ver Ignarro *et al.*, 1994).

Embora o alvo efetor endógeno do NO mais estudado seja a GCs, *in vivo* o NO também é capaz de interagir com o oxigênio, radicais de oxigênio e proteínas contendo metais e grupamentos tióis, os quais, por esta razão, constituem importantes alvos de interação para o NO, que podem levar ou não a importantes efeitos biológicos. Por exemplo, a interação do NO com o grupamento heme da hemoglobina origina a metahemoglobina, enquanto ao interagir com a oxihemoglobina o NO pode ser facilmente convertido a nitrato por meio de uma reação oxidativa. Estes dois eventos podem contribuir para a inativação do NO. Por outro lado, a reação entre o NO e o ânion superóxido (com formação de peroxinitrito e radicais hidroxil ou ácido peroxinitroso), além de servir como meio de inativação do NO (ou do ânion superóxido), pode estar envolvida em importantes danos oxidativos contra o próprio organismo ou contra agentes patógenos, dependendo das circunstâncias existentes. Já a interação do NO com tióis livres — dos quais o principal tiól intracelular é o glutathione — proporciona a formação de compostos S-nitrosotióis. Estes compostos são considerados verdadeiros estoques intracelulares de NO, pois possuem estruturas muito mais estáveis (geralmente têm meia-vida de horas) e mantêm as mesmas propriedades biológicas deste gás, ao atuarem como

verdadeiros doadores endógenos de NO (para detalhes acerca de S-nitrosotióis, ver Butler & Rhodes, 1997).

O NO pode ainda alterar a função de proteínas sinalizadoras, receptores, enzimas, canais iônicos e fatores de transcrição, ao interagir com grupamentos heme ou grupamentos tióis presentes em locais estratégicos, como o sítio ativo ou o sítio alostérico (Stamler, 1994). Por exemplo, o NO reage em um processo de nitrosilação direta com proteínas alvo. Esta reação tem sido denominada “estresse nitrosativo” e está implicada na inativação, pelo NO, do receptor ionotrópico glutamatérgico do tipo *N*-metil-D-aspartato, da proteína sinalizadora p21ras, da proteína quinase C e do fator de transcrição OxyR, dentre outros (para revisão ver Clancy *et al.*, 1998).

A GCs (encontrada no citosol), é uma enzima heterodímera com 150-kDa, expressa em muitos tipos celulares, como células do músculo liso vascular, miócitos cardíacos e plaquetas (Dierks & Burstyn, 1998). Nas plaquetas, o aumento dos níveis de GMPc inibe a agregação plaquetária, enquanto no tecido cardíaco, a ativação da GC pode atenuar a contratilidade miocárdica (Kelly *et al.*, 1996). Nas células do músculo liso vascular, a ativação da GCs causa o relaxamento muscular, que está associado a um aumento nos níveis intracelulares de GMPc (Murad, 1986). O acúmulo de GMPc conduz à ativação de proteínas quinases dependentes de GMPc (que fosforilam a cadeia leve de actina-miosina), além de, em alguns tecidos, modular a atividade de fosfodiesterases e canais iônicos. Entretanto, embora a ativação da GCs provavelmente seja o mecanismo primário pelo qual o NO induz o relaxamento do músculo liso vascular, o GMPc parece não ser o único responsável por este processo. Recentemente tem sido demonstrado, em experimentos *in vitro*,

que o próprio NO é capaz de agir, por exemplo, diretamente sobre canais de K⁺ ativados por cálcio (Bolotina *et al.*, 1994; Mistry & Garland, 1998). Estes resultados têm levantado a hipótese de que a hiperpolarização evocada pelo NO, através da abertura de canais de K⁺, provavelmente como resultado de S-nitrosilação de algum resíduo de cisteína crítico para o funcionamento do canal, possa estar também envolvida, em alguns tipos de vasos, no processo de vasodilatação induzido pelo NO. A importância dos canais de potássio na regulação da pressão arterial será abordada posteriormente.

1.6.4 Aspectos fisiopatológicos do óxido nítrico: envolvimento no choque séptico

O óxido nítrico, derivado das enzimas constitutivas, é um importante determinante, por exemplo, da homeostasia da pressão arterial e da agregação plaquetária, além de estar envolvido na transmissão nervosa central e periférica (Moncada *et al.*, 1991).

Estudos recentes têm demonstrado que a nNOS desenvolve um papel importante não apenas em funções neuronais, como liberação de neurotransmissores, desenvolvimento neuronal, regeneração, plasticidade sináptica e regulação da expressão gênica, mas também em uma variedade de desordens nas quais a produção excessiva de NO causa problemas neurológicos (para revisão ver Yun *et al.*, 1997). Por exemplo, inúmeras evidências implicam o NO como um mediador de neurotoxicidade, especialmente em resposta à ativação de receptores NMDA pelo glutamato, durante um acidente vascular cerebral e em patologias como as doenças de Alzheimer e de Huntington (para revisão ver Zhang & Snyder, 1995).

No leito vascular, a eNOS, que possui 135 kDa, é ativada por diversos

receptores de membrana (como receptores bradicinérgicos e muscarínicos) e pelo aumento no fluxo sanguíneo (*shear stress* ou estresse de cisalhamento). A demonstração da existência de uma liberação fisiológica contínua de NO no leito vascular adveio de trabalhos como o realizado por Rees *et al.* (1989), que demonstraram que a administração de L-NMMA, um análogo da L-arginina e inibidor da NOS, causava um estado de hipertensão arterial que era totalmente revertido pela administração de L-arginina. A importância da liberação fisiológica de NO no controle da pressão arterial foi confirmada com a obtenção de camundongos *knockout* para a eNOS (Huang *et al.*, 1995; Shesely *et al.*, 1996). Esta liberação basal de NO é regulada pelo *shear stress*, e, embora não se conheça exatamente como a superfície luminal é capaz de perceber as alterações no fluxo e na pressão interna dos vasos (talvez através de alterações no citoesqueleto endotelial ou estruturas vizinhas), a ativação da eNOS, mediada por esse mecanismo, é ao menos em parte consequência de aumentos nas concentrações intracelulares de cálcio (para revisão ver Busse & Fleming, 1995). Além disso, no sistema cardiovascular, o NO ainda previne a ativação de plaquetas, limita a adesão de leucócitos ao endotélio e regula a contratilidade do miocárdio (para revisão ver Nava *et al.*, 1995).

A redução da produção de NO pela eNOS vem sendo envolvida em inúmeras situações patológicas, tais como a hipertensão arterial, a hipertensão pulmonar e a aterosclerose. Entretanto, o envolvimento do NO nestas doenças permanece pouco claro. No caso da hipertensão arterial espontânea, por exemplo, a produção de NO parece estar elevada, mas isto não é suficiente para normalizar os níveis pressóricos (para revisão ver Nava *et al.*, 1995). Em ratos espontaneamente hipertensos é

possível que a quantidade de NO produzida seja ineficaz para garantir a homeostasia devido a um aumento na sua inativação. Um desequilíbrio entre os níveis de superóxido e superóxido dismutase nas paredes dos vasos tem sido sugerido como uma das causas desta maior inativação de NO (Nakazono *et al.*, 1991 *apud* Nava *et al.*, 1995). Por outro lado, a hipertensão em ratos Dahl/Rapp (isto é, deficientes em vasopressina), foi completamente abolida por suplementação com L-arginina (Chen & Sanders, 1991), o que sugere que o NO pode ter um importante papel na instalação da hipertensão arterial, dependendo dos fatores que a desencadeiam.

Se por um lado a redução da produção basal de NO pode estar envolvida na gênese de doenças cardiovasculares, a expressão da iNOS e consequente produção de quantidades de NO maiores do que as fisiológicas ocorre em um grande número de doenças. Em roedores, o NO produzido pela iNOS de macrófagos ativados desenvolve um papel fundamental como molécula citotóxica contra diversos parasitas e células tumorais (Moncada *et al.*, 1991; para revisão ver Fang, 1997). Uma expressão similar de iNOS ocorre também em macrófagos de humanos em uma série de doenças infecciosas, o que é um importante indício de uma participação primordial do NO também na atividade citotóxica das células de defesa de humanos (Kröncke *et al.*, 1998). A expressão de iNOS durante períodos prolongados e contínuos têm, no entanto, sido relacionada a algumas doenças auto-imunes, como artrite reumatóide e esclerose múltipla, a eventos isquêmicos (como infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral), a processos neurodegenerativos (como a demência decorrente da AIDS e as doenças de Parkinson e de Alzheimer), bem como a doenças inflamatórias crônicas das vias aéreas (asma), dos rins

(glomerulonefrites) e da pele (lupus eritematoso cutâneo, dermatites), dentre outras. Embora em experimentos com animais de laboratório a inibição da iNOS melhore muitos dos sintomas relacionados às doenças listadas anteriormente, o grau exato de benefícios e/ou danos gerados pela atividade da iNOS em humanos durante estas doenças ainda não é completamente compreendido (para revisão ver Kröncke, 1998).

A produção excessiva de NO parece ser uma das principais causas de alguns dos sintomas do choque séptico (Fleming *et al.*, 1990; Wright *et al.*, 1992; Wu *et al.*, 1996). Neste caso a iNOS é expressa em células fagocíticas, como macrófagos (Marletta *et al.*, 1988; Hibbs *et al.*, 1988; Stuehr *et al.*, 1989b) e neutrófilos (McCall *et al.*, 1989), células endoteliais (Radomski *et al.*, 1990) e células do músculo liso vascular (Knowles *et al.*, 1990), dentre outras, em resposta a produtos bacterianos e/ou citocinas (como o IFN- γ , a IL-1 β e o TNF- α , por exemplo).

A utilização de inibidores da NOS tem mostrado-se apta a restabelecer níveis pressóricos normais tanto nas primeiras horas após a administração de LPS (Kilbourn *et al.*, 1990; Klabunde & Ritger, 1991; Teale & Atkinson, 1992) como até 18 horas após a indução do choque endotoxêmico (Rees *et al.*, 1998), além de melhorar os índices de sobrevivência em modelos de sepsis (Wu *et al.*, 1995; Strand *et al.*, 1998) e atenuar a falência múltipla de órgãos e a falência circulatória decorrentes da administração de LPS em ratos (Wu *et al.*, 1996). Entretanto, Laubach *et al.* (1995) mostraram que, apesar de camundongos *knockout* para o gene da iNOS serem menos susceptíveis a alguns sintomas do choque séptico, estes animais não são resistentes a doses letais de LPS. Além disso, embora a expressão de iNOS esteja associada também à depressão da atividade cardíaca

existente durante o choque séptico (Schulz *et al.*, 1992; Stein *et al.*, 1996), a inibição da atividade da NOS tem mostrado-se ineficaz em restabelecer a função cardíaca tanto nas fases iniciais (Klabunde & Coston, 1995) como tardias (Keller *et al.*, 1995) do choque endotoxêmico. Diversos estudos em animais (por exemplo Wright *et al.*, 1992) e em humanos (Petros *et al.*, 1994) têm apontado a inibição da NOS como benéfica (Mulder *et al.*, 1994; Kiehl *et al.*, 1997; Avontuur *et al.*, 1998a; Avontuur *et al.*, 1998b) ou prejudicial (Petros *et al.*, 1994; Sakiniene *et al.*, 1997) durante o choque séptico. Estas diferenças podem decorrer da utilização de inibidores não-seletivos, das doses utilizadas e das condições experimentais implementadas. Como sugerido por Wright *et al.* (1992), os efeitos benéficos da utilização de inibidores da NOS parecem estar relacionados à inibição da isoforma induzida, enquanto os efeitos deletérios relacionados à inibição das enzimas constitutivas. Mesmo assim, ao buscar-se uma inibição seletiva da iNOS, deve-se considerar que o NO gerado por esta enzima possui, ao menos inicialmente, uma função citotóxica contra agentes patógenos.

Parece existir um consenso quanto à participação do NO no fenômeno de hiporresponsividade a vasoconstritores que se instala durante o choque séptico (Julou-Shaeffer *et al.*, 1990; Gray *et al.*, 1990; Gray *et al.* 1991; Vallance *et al.*, 1992; Cai *et al.*, 1996). Diversos autores têm demonstrado que a inibição da atividade da NOS em ratos tratados com LPS é capaz de restaurar as respostas *in vivo* para diferentes agentes vasoconstritores, como a endotelina-1 (Hollenberg *et al.*, 1997) e a noradrenalina (Hom *et al.*, 1995), por exemplo. Além do mais, a inibição da guanilato ciclase com azul de metileno parece ser capaz de reverter este quadro de hiporresponsividade a vasoconstritores (Fleming *et al.*, 1991) e melhorar a pressão

arterial média e outros parâmetros vasculares em ambos, animais endotoxêmicos (Zhang *et al.*, 1995; Cheng & Pang, 1998) e humanos com choque séptico (Schneider *et al.*, 1992; Gachot *et al.*, 1995; Daemen-Gubbels, 1995). Curiosamente, embora o aumento na produção de GMPc durante o choque séptico seja comumente relacionado à produção de NO, Wu e colaboradores têm acrescentado evidências acerca da ativação da guanilato ciclase através de uma via independente da ação do NO, a qual seria responsável por alguns sintomas do choque séptico, como a própria hiporresponsividade a vasoconstritores (Wu *et al.*, 1994; Wu *et al.*, 1998).

Recentemente, Hall *et al.* (1996) demonstraram evidências sobre a existência de uma ativação anormal de canais de potássio induzida pela incubação de LPS em preparações isoladas de aorta de rato. Anteriormente, Miyoshi & Nakaya (1994) já haviam demonstrado, em cultura de células de músculo liso da artéria coronária de porcos, que a exposição ao LPS e indução da iNOS era capaz de prolongar o período de abertura de canais de K⁺ ativados por cálcio. Em uma linha de resultados semelhantes, Price *et al.* (1997) sugeriram inclusive que, 180 minutos após a exposição ao LPS, os efeitos relaxantes da acetilcolina em arteríolas do músculo cremaster esquerdo de ratos anestesiados passam a envolver a ativação de canais de K⁺ ativados por cálcio. Da mesma forma, a hiporreatividade á fenilefrina, em experimentos com anéis de aorta isolados de animais endotoxêmicos, parece contar com o envolvimento de canais de potássio, muito provavelmente aqueles ativados por cálcio (Wu *et al.*, 1998).

Mesmo frente aos inúmeros trabalhos existentes, pode-se perceber que os mecanismos celulares envolvidos na hiporreatividade do músculo liso vascular a

agentes vasoconstritores durante o choque séptico permanecem mal esclarecidos (Kilbourn *et al.*, 1997). A utilização de LPS na maior parte dos estudos que avaliam os sintomas do choque séptico é, sem dúvida, um dos fatores que contribuem para esta lacuna de conhecimentos. Considerando-se que o LPS estimula a liberação de uma vasta lista de mediadores, dos quais vários apresentam efeitos cardiovasculares (para revisão ver Brandtzaeg, 1996a), a utilização de endotoxinas em modelos de choque séptico pode, algumas vezes, demonstrar-se inadequada, uma vez que limita estudos que buscam avaliar a participação de substâncias específicas neste processo. Desta forma, a maior parte dos aspectos que apontam para o envolvimento do NO, no fenômeno de hiporresponsividade a vasoconstritores existente no choque séptico, são evidências indiretas, obtidas através da administração de inibidores da NOS, da análise da expressão de iNOS e dosagem dos níveis de nitrato e nitrito, dentre outros.

Por esta razão, nós avaliamos a relação entre a exposição do sistema cardiovascular de ratos a quantidades excessivas de NO e os efeitos de compostos vasoativos, do ponto de vista hemodinâmico. Com este intuito, buscamos desenvolver um modelo experimental que possibilitasse o estudo direto dos efeitos do NO sobre as respostas vasculares a substâncias vasoconstritoras e vasodilatadoras, para o que utilizamo-nos da infusão de doadores de NO. Como nossos resultados demonstrarão, este modelo mimetiza notavelmente algumas alterações vasculares existentes no choque séptico, sem a necessidade da utilização de LPS. Finalmente, canais de K⁺ parecem estar diretamente relacionados às alterações na responsividade vascular induzidas, *in vivo*, pela administração de doadores de NO.

1.7 Importância dos canais de potássio na função vascular: modulação pelo óxido nítrico e outras substâncias derivadas do endotélio

O potencial de membrana é o principal determinante do tônus vascular, particularmente na vasculatura de resistência, responsável pela regulação da pressão sanguínea sistêmica e da pressão de perfusão orgânica. A despolarização da membrana aumenta, enquanto a hiperpolarização diminui a atividade de canais de cálcio voltagem-dependentes, presentes na musculatura vascular, os quais causam alterações nas concentrações intracelulares de cálcio, fator que regula os fenômenos de vasoconstrição e vasodilatação. O potencial de membrana no músculo liso vascular é determinado pela permeabilidade da membrana a diversos íons, incluindo o potássio, o cálcio, o sódio e o cloreto. Outros mecanismos de transporte, além dos canais iônicos, como a bomba Na⁺/K⁺ ATPase e o transporte de ânions, podem contribuir para a permeabilidade iônica de membrana. Dentre estas estruturas, os canais de potássio destacam-se na regulação do potencial de membrana do músculo liso vascular, pois o bloqueio destes canais resulta em uma despolarização substancial da membrana, enquanto a ativação dos mesmos conduz a uma pronunciada hiperpolarização e inibição da força de contração vascular, devida, em parte, à redução da concentração intracelular de cálcio (Brayden, 1996; Okada *et al.*, 1993).

Nas últimas décadas, um grande número de canais iônicos tem sido descrito nas células endoteliais e células do músculo liso, mas as características, distribuição, modulação e identidade molecular destas estruturas permanece alvo de intensos estudos. Sabe-se que existem pelo menos 4 tipos diferentes de canais de potássio, denominados, de acordo com suas características principais, como canais

(de potássio) retificantes (K_{IR}), canais voltagem-dependentes (K_V), canais sensíveis ao ATP (K_{ATP}) e canais ativados por cálcio (K_{Ca}). Estes últimos são ainda classificados em três subclasses, de acordo com a permeabilidade que apresentam, em i) canais K_{Ca} de alta condutância, também denominados de *Big channels* (BK_{Ca}), que apresentam condutância entre 165 e 220 pS, ii) canais K_{Ca} de média condutância, ou condutância intermediária (MK_{Ca}/IK_{Ca}), que apresentam condutância entre 30 e 80 pS e iii) canais K_{Ca} de baixa condutância (SK_{Ca}), que apresentam condutância de aproximadamente 10 pS. Todos estes canais atuam integrando a variedade de estímulos vasoconstritores e vasodilatadores existentes, tanto sob condições fisiológicas como patológicas, sempre através da regulação do potencial de membrana e do estado de contratilidade celular (para revisão ver Brayden, 1996 e Nilius *et al.*, 1997). O Quadro 2 descreve os tipos de canais de K⁺ conhecidos, suas principais características e as substâncias capazes de bloqueá-los ou ativá-los.

Diferentes mecanismos podem estar envolvidos na modulação de canais de potássio por segundos mensageiros, mas eventos de fosforilação e defosforilação dos canais vêm sendo considerados os mais usuais (Catterall *et al.*, 1991). Além disso, os canais de K⁺ podem ser modulados pela interação direta com a proteína G (Yatani *et al.*, 1987), ações de produtos da fosfolipase A₂ (Piomelli *et al.*, 1987) e pela interação direta com cálcio (Dubinsky & Oxford, 1985), dependendo da espécie e tecido em estudo.

Como já foi antecipado, recentes evidências têm demonstrado que os canais de K⁺ podem ainda ter sua ativação modulada pelo NO. Embora em uma primeira instância seja óbvio que, uma vez que vasodilatadores endotélio-dependentes (os quais têm seus efeitos mediados por NO) agem estimulando a entrada de cálcio

Quadro 2: Características gerais dos canais de potássio.

Tipo de canal	Descrição	Mecanismos regulatórios	Bloqueadores	Ativadores
BK _{Ca}	canal de K ⁺ sensível ao Ca ²⁺ de alta condutância	sensível à voltagem	iberiotoxina caribdotoxina noxiutoxina penitrem-A tetraetilamônio	NS004 NS1619 DHS-1
IK _{Ca}	canal de K ⁺ sensível ao Ca ²⁺ de condutância intermediária	pequena ou nenhuma sensibilidade à voltagem	cateidil trifluoroperazina haloperidol caribdotoxina clotrimazole tetraetilamônio	—
SK _{Ca} **	canal de K ⁺ sensível ao Ca ²⁺ de baixa condutância	pequena ou nenhuma sensibilidade à voltagem	apamina leiuotoxina I (+)-tubocurarina tetraetilamônio	—
K _{IR}	canal de influxo retificante	Mg ²⁺ e poliaminas intracelulares responsáveis pelo influxo de retificação	LY97241 veneno de víbora Sr ²⁺ Ba ²⁺ Cs ⁺ tetraetilamônio	—
K _{ATP}	canal de K ⁺ sensível ao ATP	inibido pelo ATP sensível ao pH facilitado pelo difosfato de nucleosídeo	glibenclamida tolbutamida fentolamina ciclazindol lidocaína tetraetilamônio	levcromacalin diazoxida apricalin pinacidil
K _V	canal de K ⁺ ativado pela voltagem	ativação retardada inativação lenta	4-aminopiridina tetraetilamônio caribdotoxina	—
K _{Na}	canal de K ⁺ ativado pelo Na ⁺	insensível à voltagem	Ca ²⁺ Ba ²⁺	—
K _{Vol}	canal de K ⁺ sensível ao volume	ativado pelo aumento do volume celular	quinidina lidocaína cetiedil	—
K _{ACh}	canal de K ⁺ ativado pelo receptor muscarínico atrial	sensível à voltagem retificante de influxo	Ba ²⁺ Cs ⁺ 4-aminopiridina tetraetilamônio quinina	—

* existem três diferentes SK clonados: SK1, SK2 e SK3. SK2 e SK3 são susceptíveis à apamina e à (+)-tubocurarina, enquanto o SK1 é resistente a estes dois bloqueadores.

Outros tipos de canais de K⁺ menos conhecidos foram omitidos da tabela.

FONTE: Receptor & Ion Channel Nomenclature Supplement, *TIPS.*, 87-91, 1998.

para o meio intracelular, e que este fato isolado já é capaz de estimular canais de K_{Ca}, aumentando o influxo de potássio, hiperpolarizando as células endoteliais e aumentando o gradiente eletroquímico, o NO parece ser capaz de ativar múltiplos tipos de canais de potássio (Koh *et al.*, 1995), podendo isto ocorrer como um efeito direto (Bolotina *et al.*, 1994; Mistry & Garland, 1998) ou através da ativação de proteínas quinases dependentes de GMPc (Archer *et al.*, 1994).

Embora no passado inúmeros autores tenham sugerido que o NO era incapaz de causar alterações no potencial de membrana, e que portanto, seus efeitos não estavam relacionados a eventos de hiperpolarização (por exemplo Huang *et al.*, 1988; Beny & Brunet, 1988; Komori *et al.*, 1988), a vasodilatação ou o relaxamento induzido por algumas substâncias endógenas, como a acetilcolina (ver Brayden *et al.*, 1991), a bradicinina (Berg & Koteng, 1997) e o próprio NO (Bolotina *et al.*, 1994), bem como de vasodilatadores exógenos usados na clínica, como o trinitrato de glicerila (Ishibashi *et al.*, 1995) e o nitroprussiato de sódio (Thirstrup & Nielsen-Kudsk, 1992; Ishibashi *et al.*, 1995), vêm já há alguns anos sendo atribuídos, ao menos em parte, à hiperpolarização causada pela ativação de canais de K⁺. De fato, Tare *et al.* (1990) demonstrou que o NO, seja ele derivado do endotélio ou de drogas nitrovasodilatadoras, pode mediar tanto o relaxamento como a repolarização/hiperpolarização do músculo liso arterial, além de demonstrar que para isso, algumas vezes, são necessárias concentrações de NO maiores do que as concentrações utilizadas para causar apenas os efeitos relaxantes, sugerindo que talvez esta tenha sido uma das razões que levou inúmeros autores a não visualizar a indução de hiperpolarização pelo NO.

Além da modulação pelo NO, a regulação da atividade dos canais de K⁺ vem

sendo relacionada, em diversos modelos experimentais, com a ação do fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF, do inglês *endothelium-derived hyperpolarizing factor*). A descoberta do EDHF adveio das observações de Taylor & Weston (1988), que reportaram a liberação de um outro fator, diferente do EDRF, durante o relaxamento vascular dependente do endotélio. Segundo os autores, este novo fator poderia contribuir no processo de relaxamento vascular, através de um aumento no potencial de membrana (hiperpolarização) das células do músculo liso. A demonstração por Chen *et al.* (1988) de que, em preparações como a artéria aorta e a artéria pulmonar de ratos, a resposta relaxante ao NO derivado do endotélio era bloqueada através da adição de hemoglobina (que liga-se ao NO e o inativa) e de azul de metileno (que inibe a guanilato ciclase), independentemente do fenômeno de hiperpolarização do músculo liso, criou evidências diretas para a existência da liberação endotelial do EDHF (para revisão ver Garland *et al.*, 1995).

Embora mais de uma década tenha se passado desde a descoberta do EDHF, a identidade do mediador (ou mediadores) responsável pela hiperpolarização atribuída a este fator permanece desconhecida. Entretanto, diversas substâncias vêm sendo sugeridas como responsáveis pelos efeitos do EDHF, dentre as quais incluem-se o óxido nítrico, ácidos epoxieicosatrienóicos, endocanabinóides, prostaciclina, espécies reativas de oxigênio e o monóxido de carbono (para revisão detalhada ver Mombouli & Vanhoutte, 1997). Recentemente, o próprio íon K⁺, originário de células endoteliais, foi apontado como mais um possível candidato à identidade do EDHF (Edwards & Weston, 1998).

O mecanismo pelo qual o EDHF induz alterações no potencial de membrana do músculo liso está associado a um aumento na condutância da membrana, o qual

parece refletir um aumento na permeabilidade de íons potássio. Embora não esteja definido qual o tipo de canal de potássio responsável pelos efeitos do EDHF, o envolvimento de canais de potássio sensíveis ao ATP, voltagem-dependentes e ativados por cálcio vêm sendo demonstrado, dependendo do tipo de preparação ou tecido estudado. Por exemplo, em preparação perfundida do leito mesentérico arterial de rato, a vasodilatação induzida pela acetilcolina, que parece ser predominantemente mediada por EDHF, é totalmente abolida por apamina, sugerindo que o EDHF pode agir através de canais de SK_{Ca} (para revisão detalhada ver Garland *et al.*, 1995). Por sua vez, Petersson *et al.* (1997) demonstraram que o relaxamento mediado por EDHF em artérias cerebrais é inibido através da associação de caribdotoxina e apamina, duas substâncias reconhecidas como bloqueadoras de canais de SK_{Ca} e K_V, respectivamente, sugerindo que, ao menos em artérias cerebrais, estes dois tipos de canais de K⁺ podem ser ativados pelo EDHF.

Como pôde ser visto acima, canais de potássio desempenham um importante papel na excitabilidade e, conseqüentemente, na função celular. O envolvimento destes canais iônicos na regulação de processos fisiológicos e na instalação de quadros patológicos tem estimulado o desenvolvimento de diversas drogas, das quais muitas estão em avaliação clínica ou experimental e destinam-se, por exemplo, ao uso como agentes antifibrilantes ou antiarrítmicos (inibidores de canais de K⁺, a Classe III dos agentes antiarrítmicos), protetores contra a isquemia cardíaca, anti-hipertensivos e anti-asmáticos (para revisão ver Escande & Standen, 1994). Certamente, ampliar o conhecimento acerca dos fatores que podem modular ou alterar a funcionalidade de diferentes tipos de canais de K⁺, seja em condições

fisiológicas ou patológicas, pode criar novos alicerces para o tratamento de inúmeras doenças e contribuir para o desenvolvimento de terapias que visem a modulação destes canais.

II – Objetivos

Este estudo teve como objetivo investigar a participação do óxido nítrico na origem e manutenção das alterações na responsividade vascular existentes durante o choque séptico, sem a administração de LPS e, portanto, sem o envolvimento de uma série de mediadores liberados nesta condição patológica. Para isso, os seguintes objetivos específicos foram delineados:

- a) Desenvolver um modelo experimental, através da infusão de doadores de NO, que mimetizasse a exposição do sistema cardiovascular a quantidades de NO superiores às fisiológicas, como ocorre durante o choque séptico;
- b) Examinar as consequências da infusão de doadores de NO sobre a responsividade vascular à diferentes vasoconstritores e vasodilatadores;
- c) Avaliar o envolvimento de canais de K^+ nas alterações da responsividade vascular à fenilefrina e à bradicinina, desencadeadas pela infusão de doadores de NO.

III – Material e Métodos

3.1 Animais utilizados

Para a realização deste estudo, foram utilizados ratos Wistar, fêmeas e machos (utilizados de forma randômica), com 3 a 4 meses de idade e pesos variando entre 170/220 g e 250/300 g, respectivamente. Todos os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina e mantidos no Biotério Setorial da Coordenadoria Especial de Farmacologia até a realização dos experimentos. A temperatura ambiente ($22 \pm 2^\circ \text{C}$) e o ciclo de luz claro/escuro (12/12 h) foram controlados automaticamente. Os animais tiveram livre acesso à alimentação e água até o momento do experimento.

3.2 Procedimentos cirúrgicos

Todos os procedimentos descritos a seguir foram realizados de acordo com as Diretrizes de Cuidados com Animais de Laboratório do Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos da América (NIH; USA). Para a mensuração da pressão arterial, os animais foram anestesiados com uma mistura de cetamina e xilazina (90 e 15 mg/kg, respectivamente, administrada pela via intramuscular e suplementada a intervalos de 45 a 60 min), como sugerido por Gratton *et al.* (1995). Após a fixação em decúbito ventral sobre a mesa cirúrgica, a veia femoral esquerda foi localizada e dissecada (Figura 1, foto 1) para a inserção de uma agulha conectada a um cateter de polietileno (PE 20), destinado à administração das drogas e soluções empregadas neste estudo (Figura 1, foto 2). Imediatamente após a canulação da

veia femoral, 30 UI de heparina, diluída em solução salina tamponada com fosfato de Dulbecco (PBS, composto, em mM, por: NaCl 137, KCl 2.7, KH₂PO₄ 1.5, NaHPO₄ 8.1; pH 7.4), foi administrada para prevenir coágulos e obstrução das cânulas. Em seguida, todos os animais foram traqueostomizados e mantidos sob respiração espontânea. A artéria carótida direita de cada animal foi localizada e cuidadosamente isolada do nervo vago e tecidos adjacentes. Com o auxílio de linha de sutura, o fluxo sanguíneo da artéria carótida foi interrompido na altura de sua extremidade distal, enquanto o fluxo em sua extremidade proximal foi temporariamente suprimido pela compressão com uma pinça curva. Utilizando-se uma tesoura oftalmológica, um pequeno corte foi realizado na região medial da porção da artéria carótida clampeada (Figura 1, foto 3), servindo como via para a inserção de um cateter de polietileno (PE 20), devidamente heparinizado, que foi firmemente conectado à artéria e destinou-se à mensuração contínua da pressão arterial, frequência cardíaca e coleta de amostras de sangue (Figura 1, foto 4).

Durante o experimento, todos os animais tiveram a temperatura corporal monitorada (através de um termômetro retal) e mantida entre 35 e 37° C. Quando necessário, uma pequena incisão foi realizada na cavidade abdominal para a localização da bexiga urinária e inserção de um cateter para a obtenção de amostras de urina.

Os valores da pressão arterial média (PAM) e da frequência cardíaca (FC) foram registrados em um computador PC, a intervalos de 10 segundos, por um equipamento de análise de pressão arterial Digi-Med (Modelo 190, NY, EUA), conectado a um software de integração Digi-Med (Modelo 200) em um sistema operacional Windows 95™ (Microsoft Corporation, EUA). Os dados apresentados,

referentes à PAM (mmHg) e à FC (bpm), representam a média dos valores registrados no momento do efeito máximo produzido pelo composto administrado. Ao término dos experimentos, todos os animais foram sacrificados através de uma *overdose* de tiopental (acima de 40 mg/kg, i.v.).

3.3 Protocolo experimental

3.3.1 Indução do choque endotoxêmico

Com o objetivo de ilustrar as alterações na responsividade vascular existentes durante o choque séptico, diferentes grupos de ratos foram tratados com uma injeção de LPS (10 mg/kg, i.p.) obtido de *E. coli* (sorotipo 0111:B4) ou PBS estéril (1 ml/kg, i.p.). Oito ou 24 h após este tratamento, os animais foram preparados para o registro da pressão arterial, como descrito anteriormente. Respeitado um intervalo de 30 min após o término da manipulação cirúrgica, uma curva dose-resposta (3, 10 e 30 nmol/kg) para a fenilefrina ou para a bradicinina foi obtida. Todas as doses foram administradas em *bolus* em um volume de 50 µl, seguidos por 150 µl de PBS estéril, para garantir a completa injeção da droga ao longo do cateter. Apenas uma substância foi testada em cada animal. Uma descrição detalhada sobre os efeitos das substâncias vasoativas em situações controle é fornecida no item posterior. Ao término dos experimentos, amostras de sangue arterial (300 µl cada) e urina foram coletadas. As amostras foram centrifugadas a 4000 x g durante 10 min, sendo o plasma ou o sobrenadante recuperados e armazenados a -20° C para a posterior dosagem de nitrato/nitrito (NO_x).

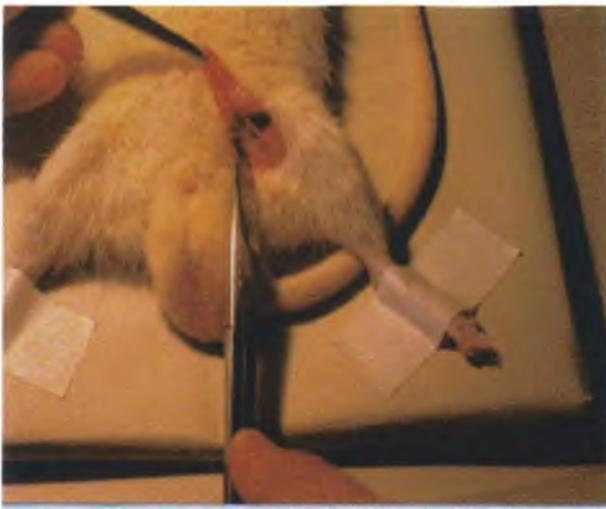


FOTO 1



FOTO 2



FOTO 3



FOTO 4



FOTO 5



FOTO 6

Figura 1: Painel fotográfico ilustrando os procedimentos adotados para o registro direto da pressão arterial de ratos anestesiados. A Foto 1 mostra a localização e dissecação da veia femoral, seguida pela sua canulação (Foto 2). Com a traqueostomia já realizada, a artéria carótida é cuidadosamente isolada e um pequeno corte é efetuado para a inserção de uma cânula de polietileno (Foto 3). Na Foto 4 vê-se a preparação completa com a cânula conectada ao transdutor de pressão. Os dados coletados são direcionados ao sistema de integração, que envia o sinal para a tela do computador. A Foto 5 ilustra o sinal de PA mostrado na tela em alta velocidade de aquisição. A Foto 6 mostra uma visão global do sistema de registro, na qual as unidades de integração são vistas ao fundo.

3.3.2 Infusão dos doadores de NO

O registro típico de um experimento em que foi utilizado fenilefrina e nitroprussiato de sódio é apresentado na Figura 4. Após a manipulação cirúrgica e um período de estabilização de 30 min, três doses crescentes de vasoconstritores (fenilefrina 3, 10 e 30 nmol/kg; angiotensina I e II 3, 10 e 30 pmol/kg) ou de vasodilatadores (acetilcolina, bradicinina e nitroprussiato de sódio 3, 10 e 30 nmol/kg; iloprost 1, 3 e 10 nmol/kg) foram administradas em *bolus*, como descrito anteriormente. Valores controle foram obtidos pela injeção de 200 µl de PBS estéril. A elevação ou redução da PAM iniciava-se imediatamente após a administração dos compostos vasoativos, perdurando de 2 a 3 minutos, sendo o pico do efeito para todas as drogas testadas observado sempre no primeiro minuto. As doses seguintes da curva dose-resposta da substância em uso foram administradas somente após a restabilização da PAM em valores próximos àqueles existentes antes da injeção precedente (geralmente dentro de um período de 5 a 10 min).

Após a obtenção da curva dose-resposta controle para cada agonista e total restabelecimento da PAM, foram implementadas infusões de nitroprussiato de sódio (SNP; 250 nmol/kg/min), S-nitroso-N-acetil-DL-penicilamina (SNAP; 85 nmol/kg/min) ou N-acetil-DL-penicilamina (NAP; 85 nmol/kg/min) durante 30 min. Com o término da infusão do SNP ou SNAP, a PAM retornava a seus níveis basais dentro de 5 a 15 min (a infusão de NAP não alterou a PAM). Em seguida, em períodos pré-determinados (30, 60, 90 e 120 min após o final da infusão), curvas dose-resposta sucessivas ao mesmo vasoconstritor ou vasodilatador testado antes da infusão foram registradas. Apenas um composto foi estudado em cada animal. Grupos

controle paralelos foram submetidos a um protocolo similar, no qual apenas PBS (20 µl/min) foi infundido durante 30 min.

Com o objetivo de investigar se as alterações na responsividade vascular, verificadas após a infusão de SNP ou SNAP, persistiam por períodos maiores do que os 120 min até então avaliados, nós testamos os efeitos da fenilefrina e da bradicinina em animais infundidos com SNP ou PBS (nas mesmas doses descritas anteriormente), 24 h antes da realização do experimento. Para isso, os animais foram mantidos sob anestesia por éter etílico durante um período aproximado de 35 min, o que permitiu a inserção e fixação de um cateter *butterfly* (escalpe n.º 23) em uma das veias caudais, que serviu como via para a infusão de SNP ou PBS, durante 30 min. Após a infusão, o cateter *butterfly* era removido e os animais acondicionados em uma caixa pré-aquecida durante o período de recuperação da anestesia (1 h). Vinte e quatro horas depois deste procedimento, os animais foram anestesiados com cetamina e xilazina e curvas dose-resposta para a fenilefrina ou para a bradicinina foram obtidas, como previamente descrito.

Em outros grupos de ratos, amostras de sangue arterial (300 µl cada) e urina foram coletadas, antes, durante e nos tempos de 60, 120, 180 e 240 min após a infusão de SNP, SNAP, NAP ou PBS. As amostras foram centrifugadas a 4000 x g durante 10 min, sendo o plasma ou o sobrenadante recuperados e armazenados a -20° C para a posterior dosagem de nitrato/nitrito (NO_x). Com o intuito de evitar alterações na PAM causadas por hipovolemia, 300 µl de PBS foram injetados i.v. após a coleta de cada amostra de sangue.

3.3.3 Tratamento com bloqueadores de canais de K⁺

Para investigar o envolvimento de canais de potássio nas alterações da responsividade vascular à fenilefrina e à bradicinina, induzidas pela infusão de doadores de NO, nós utilizamos dois diferentes protocolos experimentais.

No primeiro conjunto de experimentos, os animais foram preparados para o registro da pressão arterial e uma curva dose-resposta para a fenilefrina ou para a bradicinina foi obtida, como descrito anteriormente. Em seguida, tetraetilamônio (TEA; 360 µmol/kg), um bloqueador não seletivo de canais de K⁺, ou glibenclamida (40 µmol/kg), um bloqueador de canais de K⁺ ATP-dependentes, ou 4-aminopiridina (1 µmol/kg), um bloqueador de canais de K⁺ ativados por voltagem, foram lentamente injetados intravenosamente (em um período de 3 a 5 min). Após a estabilização da PAM (usualmente 5 a 10 min), uma infusão de SNP foi implementada, como realizado nos experimentos descritos anteriormente. Trinta minutos após o término do período de infusão, uma nova curva dose resposta para a fenilefrina ou para a bradicinina foi obtida. A influência dos bloqueadores de canais de potássio sobre os efeitos da fenilefrina e da bradicinina, em condições controle, foi avaliada em animais infundidos com PBS em substituição ao SNP.

O segundo protocolo experimental utilizado foi muito similar ao primeiro, exceto que os bloqueadores de canais de K⁺ foram administrados após a infusão de SNP. Neste caso, curvas dose-resposta para a fenilefrina ou para a bradicinina foram obtidas antes e 30 min após o fim da infusão de SNP. Após o registro da segunda curva dose-resposta para a substância vasoativa em estudo, TEA, glibenclamida ou 4-aminopiridina foram, como no protocolo anterior, lentamente administradas por via intravenosa. Após um intervalo de 5 a 10 min, suficiente para a

restabilização da PAM em valores estáveis, uma nova curva dose-resposta para a fenilefrina ou para a bradicinina foi obtida.

Os efeitos do TEA sobre as modificações de longa duração na responsividade vascular induzidas pela infusão de SNP também foram analisados. Para isso, grupos distintos de animais foram submetidos à infusão de SNP ou PBS, através da inserção de um cateter *butterfly*, como descrito anteriormente. Vinte e quatro horas após este procedimento, os animais foram anestesiados e preparados para o registro da pressão arterial e uma curva dose-resposta para a fenilefrina realizada em cada animal. Finalmente, TEA (360 µmol/kg, i.v.), foi lentamente administrado nos animais infundidos com SNP e, após a estabilização da PAM, uma nova curva dose-resposta à fenilefrina registrada.

3.3.4 Ensaio para determinação de NO_x

A metodologia utilizada para a dosagem dos valores de NO_x foi descrita detalhadamente por Granger *et al.* (1990). Basicamente, o plasma foi desproteinizado com sulfato de zinco e diluído 1:1 com água de Milli-Q. As amostras de urina não foram diluídas. Para a conversão do nitrato a nitrito, as amostras de plasma e urina foram incubadas, a 37° C e durante 2 h, em presença da nitrato redutase expressa em *E. coli*. Após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas para a remoção da bactéria, sendo 100 µl do sobrenadante misturados com o mesmo volume de reagente de Griess (1% de sulfanilamida em 10% de ácido fosfórico/0.1% de alfa-naftil-etilenodiamina em água de Milli-Q) em placas de 96 poços para leitura a 540 nm em um leitor de placas. Curvas padrão de nitrito e nitrato (0 a 150 µM) foram realizadas simultaneamente. Como nestas condições a

conversão de nitrato a nitrito foi sempre maior que 90%, nenhuma normalização dos resultados foi realizada. Finalmente, por meio de uma regressão linear, os valores foram expressos como μM de NO_x (nitrato + nitrito).

3.4 Drogas

As seguintes drogas e reagentes foram utilizadas neste estudo: fenilefrina, angiotensina I e II, acetilcolina, bradicinina, nitroprussiato de sódio, N-acetil-DL-penicilamina, sulfanilamida, alfa-naftil-etilenodiamida, nitrato de sódio, nitrito de sódio, glibenclamida, LPS de *E. coli* sorotipo 0111:B4 (todos comprados da Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, EUA), cetamina (da Parke-Davis, S. Paulo, SP, Brasil), xilazina (RonpumTM, gentilmente fornecido pela Bayer, S. Paulo, SP, Brasil), 1H-[1,2,4]-oxadiazolo-[4,3-a]-quinoxalin-1 (ODQ; uma valiosa contribuição do Dr. Fernando Q. Cunha, Faculdade de Medicina, USP, Ribeirão Preto, SP, Brasil), iloprost (uma gentil doação do Dr. E. Antunes, UNICAMP, Campinas, SP, Brasil), tetraetilamônio (Sigma) e 4-aminopiridina (RBI), gentilmente doados pela Dr. M. C. O. Salgado (Faculdade de Medicina, USP, Ribeirão Preto, SP, Brasil) e S-nitroso-N-acetil-DL-penicilamina (sintetizado pelo método de Field *et al.*, 1978). Todos os compostos foram diluídos para uso em PBS estéril, exceto a glibenclamida, que foi preparada em solução de DMSO.

3.5 Análise estatística

Os resultados estão expressos como a média \pm erro padrão da média ($n = 4-7$ animais em cada grupo). Para a análise estatística foi utilizado o teste *t* de Student para amostras pareadas ou não-pareadas, ou a análise de variância de uma via

(ANOVA) seguida pelo teste *t* de Bonferroni, quando aplicáveis. Um valor de *p* menor que 0.05 foi considerado estatisticamente significativo.

IV – RESULTADOS

4.1 Efeitos da administração de LPS

Uma vez que a administração de LPS aumentou, como esperado, os valores plasmáticos de NO_x , um indicador direto da produção de NO, de $35.2 \pm 2.3 \mu\text{M}$ ($n = 12$) nos animais tratados com PBS¹, para $131.1 \pm 13.4 \mu\text{M}$ ($n = 9$) e $135.9 \pm 7.0 \mu\text{M}$ ($n = 4$) nos animais tratados com LPS 8 e 24 h antes do experimento, respectivamente, nós consideramos que uma condição semelhante ao choque séptico, denominada choque endotoxêmico, foi induzida nestes animais. Embora inicialmente esperássemos que os animais endotoxêmicos apresentassem valores pressóricos reduzidos, a PAM dos animais tratados com LPS 8 h (90.6 ± 11.6 , $n = 12$) ou 24 h (95.3 ± 5.1 , $n = 10$) antes do experimento não diferiu da PAM dos animais que receberam apenas PBS estéril (97.6 ± 3.8 , $n = 12$). A razão para esta discrepância é desconhecida, mas pode ser devida a alguma característica peculiar à espécie de animais ou modelo utilizado, desde que mesmo quando doses maiores de LPS foram utilizadas (até 20 mg/kg), nenhuma modificação nos valores basais da PAM foi verificada (dados não apresentados). Um aumento significativo na frequência cardíaca de todos os animais tratados com LPS 8 h antes do experimento foi verificado, mas este fenômeno foi observado apenas em parte dos animais que receberam LPS 24 h antes do experimento. Em geral, os animais do grupo controle (tratados apenas com PBS) apresentaram uma frequência cardíaca em torno de 200

¹ Como os resultados obtidos nos grupos de animais tratados com PBS estéril 8 ou 24 h antes dos experimentos foram estritamente idênticos, nós optamos por representar tais resultados como os obtidos em um único grupo controle.

bpm, enquanto que nos animais tratados com LPS (8 h antes do experimento), tais valores ficaram em torno de 300 bpm (resultados não mostrados).

Os resultados mais importantes obtidos neste grupo de experimentos concernem à hiporresponsividade vascular à fenilefrina e à potencialização dos efeitos da bradicinina, decorrentes do tratamento dos animais com LPS. Como pode ser observado na Tabela 1, os efeitos da fenilefrina sobre a PAM apresentaram-se reduzidos em pelo menos 50% nos animais tratados com LPS 8 ou 24 h antes do experimento, quando comparados aos efeitos desta droga em animais tratados apenas com PBS. A Figura 2 apresenta registros típicos mostrando os efeitos da fenilefrina em animais tratados com PBS (painel A) ou LPS (painel B), 24 h antes do experimento. Como citado acima, o tratamento com LPS ocasionou uma exacerbação dos efeitos vasodilatadores da bradicinina, sendo esta potencialização similar entre os animais que receberam LPS 8 ou 24 h antes do experimento (Tabela 2). A Figura 3 apresenta um registro típico dos efeitos da bradicinina em animais tratados com PBS (painel A) ou LPS (painel B), 24 h antes da realização do experimento.

Tabela 1: Hiporresponsividade inicial e tardia à vasoconstrição induzida pela fenilefrina em ratos endotoxêmicos.

Fenilefrina (nmol/kg)	Aumento da Pressão Arterial Média (mmHg)		
	Controle	LPS 8 h ^a	LPS 24 h ^a
3	15.7 ± 1.7	6.6 ± 0.7*	7.3 ± 1.5*
10	27.2 ± 4.3	12.2 ± 1.2*	13.1 ± 3.7*
30	40.9 ± 4.0	20.7 ± 3.5*	19.2 ± 3.7*

^a LPS (10 mg/kg, i.p.) foi administrado 8 ou 24 horas antes do início do experimento. Os resultados estão expressos como a média ± erro padrão da média de 6 a 12 animais por grupo. * $p < 0.05$ (ANOVA seguida do teste t de Bonferroni) quando comparado aos resultados obtidos no grupo controle.

Tabela 2: Potencialização inicial e tardia dos efeitos vasodilatadores da bradicinina em ratos endotoxêmicos.

Bradicinina (nmol/kg)	Redução da Pressão Arterial Média (mmHg)		
	Controle	LPS 8 h ^a	LPS 24 h ^a
3	12.4 ± 1.3	19.9 ± 2.4*	26.5 ± 3.1*
10	21.6 ± 1.9	33.2 ± 1.2*	38.7 ± 3.4*
30	27.3 ± 2.9	40.5 ± 3.6*	46.4 ± 3.9*

^a LPS (10 mg/kg, i.p.) foi administrado 8 ou 24 horas antes do início do experimento. Os resultados estão expressos como a média ± erro padrão da média de 6 a 12 animais por grupo. * $p < 0.05$ (ANOVA seguida do teste t de Bonferroni) quando comparado aos resultados obtidos no grupo controle.

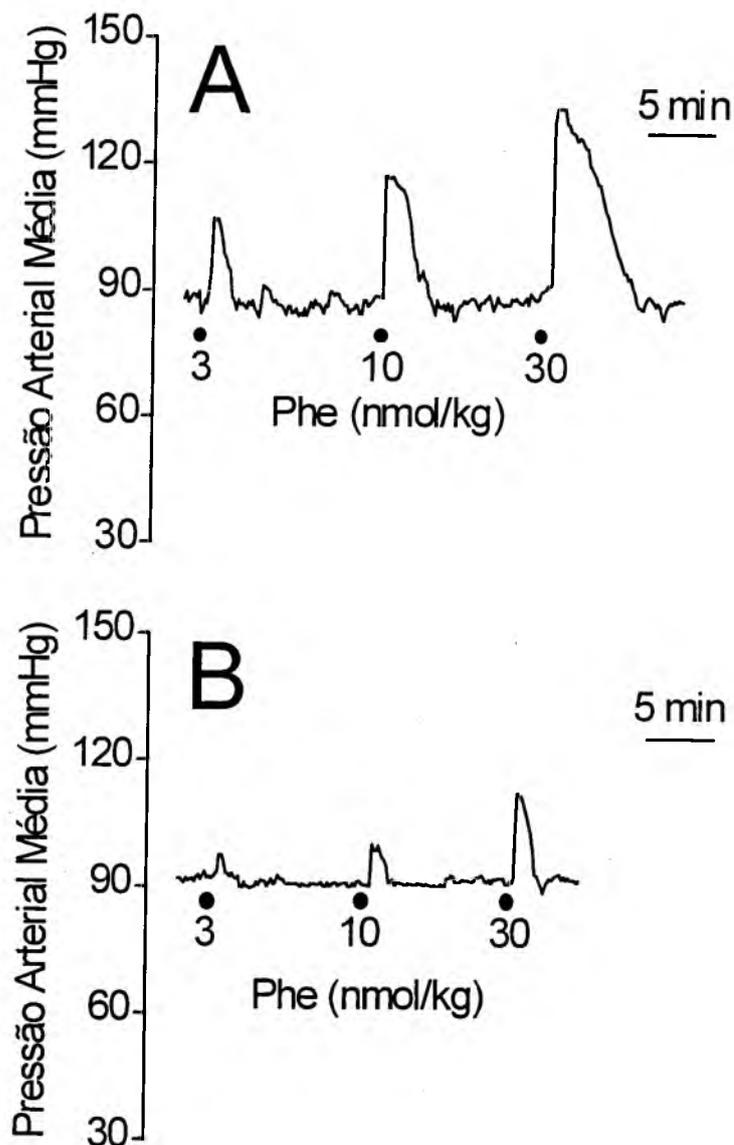


Figura 2: Hiporresponsividade vascular à fenilefrina em ratos pré-tratados com LPS. (A) Traçado típico mostrando os efeitos da administração em *bolus* de doses crescentes de fenilefrina (Phe; 3, 10 e 30 nmol/kg) sobre a PAM de um rato anestesiado tratado com PBS (1 ml/kg, i.p.), 24 h antes do experimento. (B) Registro típico dos efeitos das mesmas doses de fenilefrina em um rato tratado com LPS (10 mg/kg, i.p.), 24 h antes da realização do experimento.

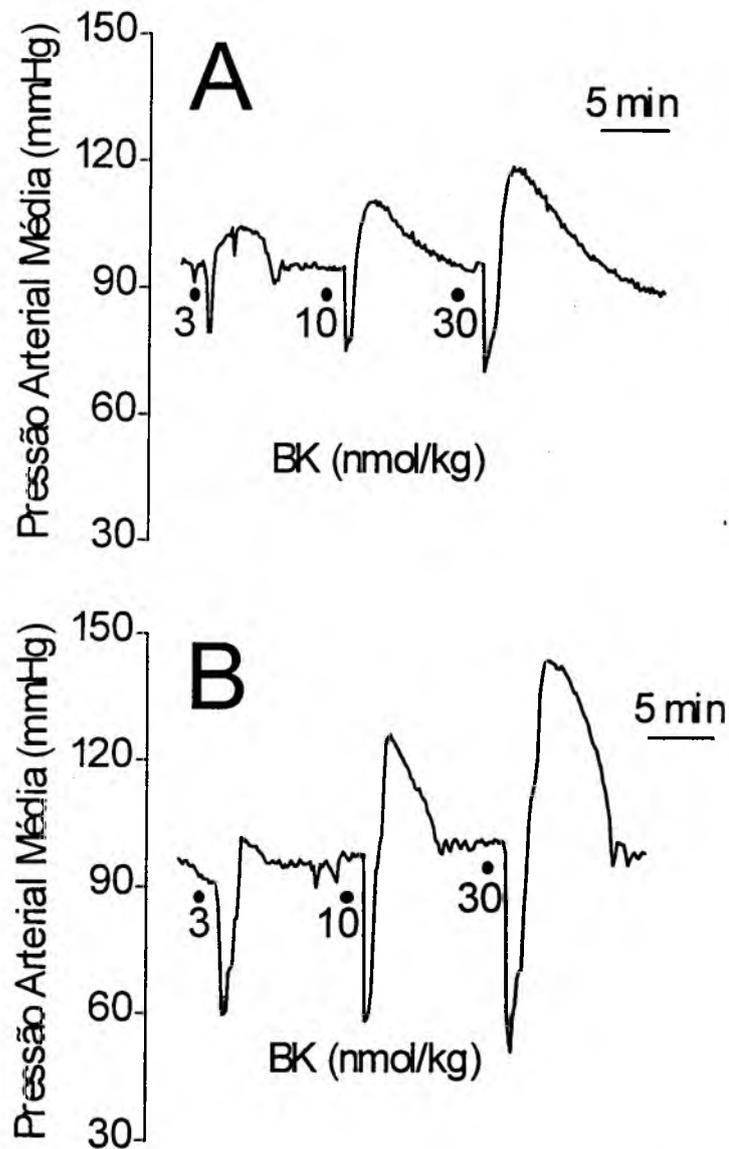


Figura 3: Potencialização dos efeitos vasodilatadores da bradicinina em ratos pré tratados com LPS. (A) Registro típico mostrando os efeitos da administração de doses crescentes de bradicinina (BK; 3, 10 e 30 nmol/kg) em um rato anestesiado tratado com LPS (1 ml/kg, i.p.), 24 h antes do experimento. (B) Efeitos das mesmas doses de bradicinina em um rato tratado com LPS (10 mg/kg, i.p.), 24 h antes do experimento.

4.2 Efeitos da infusão de doadores de NO

Um experimento em que foi utilizado fenilefrina antes e 30 min após a infusão de SNP está ilustrado na Figura 4. Em experimentos controle, todos os vasoconstritores elevaram a PAM de maneira dose-dependente (Figura 5, círculos). As respostas evocadas pela angiotensina II (dados não mostrados), foram idênticas àquelas originadas pela angiotensina I. Como descrito por vários autores (por exemplo Hu *et al.*, 1992), nós também verificamos que repetidas injeções de vasoconstritores, como a fenilefrina e as angiotensinas I e II, resultam em dessensibilização das respostas. Os efeitos da dose de 30 nmol/kg (de ambas, fenilefrina e angiotensina I), 120 min após a infusão de PBS, apresentaram uma redução estatisticamente significativa ($p < 0.05$; ANOVA seguida pelo teste *t* de Bonferroni) em relação aos efeitos obtidos 30 min após a infusão (Figura 5, círculos, painéis A e C). Por esta razão, para uma melhor análise, curvas dose-resposta subsequentes foram obtidas em animais controle, infundidos apenas com PBS estéril, a intervalos idênticos aos implementados em animais experimentais (Figura 5, círculos).

A infusão de SNP ou SNAP reduziu a PAM normal (90 ± 1.5 mmHg, $n = 83$) para valores entre 40 e 60 mmHg (veja a figura 4). Por outro lado, a frequência cardíaca não foi alterada significativamente durante ou após as infusões de SNP ou SNAP. Por exemplo, a frequência cardíaca apresentada pelos animais controle durante a infusão de PBS foi de 226 ± 8 bpm, enquanto os valores observados nos grupos experimentais durante a infusão de SNP ou SNAP foram de 208 ± 15 bpm e 235 ± 10 bpm ($n = 8-10$ cada), respectivamente. Por sua vez, nenhum destes parâmetros foi alterado pela infusão de NAP, o composto não-nitrosilado precursor do SNAP (resultado não mostrado).

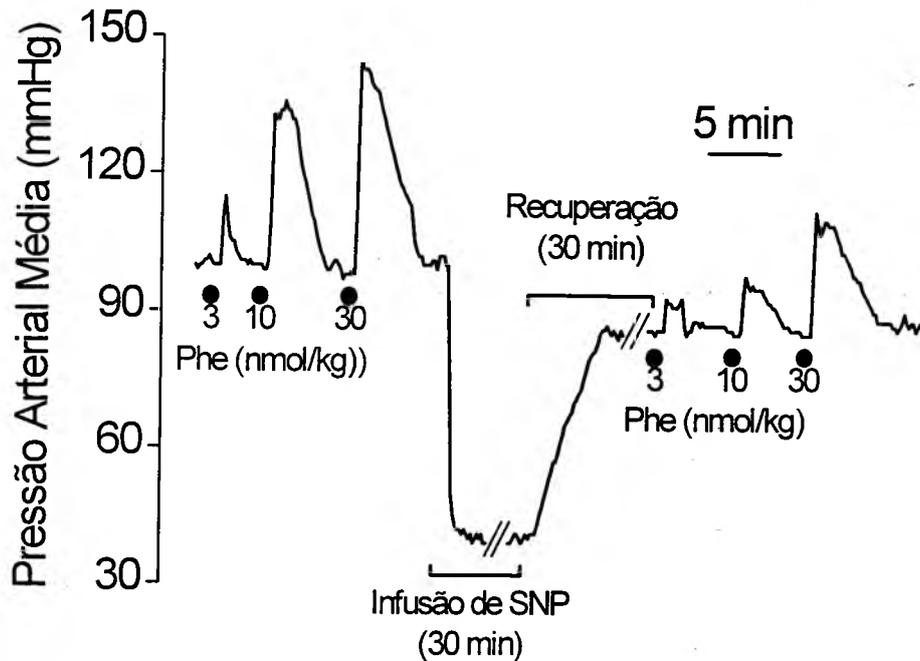


Figura 4: Registro típico da pressão arterial média de um rato anestesiado, mostrando a redução dos efeitos vasoconstritores da fenilefrina após a infusão de nitroprussiato de sódio. Inicialmente, doses crescentes de fenilefrina (3, 10 e 30 nmol/kg) foram injetadas intravenosamente em *bolus*. Cada dose foi administrada após o desaparecimento dos efeitos da dose precedente. Após a última dose de fenilefrina, foi iniciada uma infusão de nitroprussiato de sódio (250 nmol/kg/min), que reduziu e manteve a PAM em valores próximos a 40 mmHg durante os 30 min de duração. Com o término do período de infusão, um intervalo de 30 min foi respeitado, dentro do qual a PAM retornou a valores próximos aos níveis basais inicialmente registrados. Novas sequências de doses crescentes de fenilefrina foram administradas. Os traçados obtidos 60, 90 e 120 min após o término da infusão foram omitidos da Figura.

O efeito hipotensor dos dois doadores de NO utilizados perdurou ao longo de todo o período de infusão, sendo totalmente revertido 5 a 10 min após o término deste. Assim, 30 min após o final da infusão de SNP ou SNAP, os valores da PAM retornaram para 102.3 ± 2.9 ($n = 33$) e 106.8 ± 2.7 mmHg ($n = 23$), respectivamente, valores similares à média registrada em animais controle 30 min após a infusão de

PBS (94.6 ± 2.9 mmHg, $n = 28$). Embora tenhamos determinado os níveis de NO_x presentes na urina (resultados não mostrados) e no plasma dos animais antes, durante e após a infusão dos doadores de NO, apenas pequenos aumentos de NO_x foram encontradas no plasma de animais infundidos com SNP, enquanto nenhuma alteração foi verificada no plasma dos animais que receberam SNAP (Tabela 3).

Tabela 3: Efeitos da infusão de PBS (20 µl/min), SNP (250 nmol/kg/min), SNAP (85 nmol/kg/min) ou NAP (85 nmol/kg/min) sobre as concentrações plasmáticas de NO_x em ratos anestesiados.

Infusão	NO _x Plasmático ^a (µM)				
	Antes	Durante	60 min	120 min	240 min
PBS	19.3 ± 6.4	19.9 ± 5.1	20.8 ± 3.4	25.9 ± 7.1	36.6 ± 1.6
SNP	25.3 ± 6.5	48.1 ± 13.1	46.7 ± 7.7	51.9 ± 7.1	53.1 ± 4.4
SNAP	18.2 ± 2.8	27.6 ± 2.5	30.8 ± 3.8	26.5 ± 2.3	34.7 ± 3.0
NAP	19.9 ± 2.6	31.1 ± 2.9	29.6 ± 0.9	28.2 ± 1.6	36.9 ± 0.7

^a As amostras de sangue para quantificação dos valores de NO_x foram obtidas antes, durante (15 min após o início da infusão), 60, 120 e 240 min após o período de infusão de 30 min. Os valores estão expressos como a média ± erro padrão da média de 3 amostras por grupo. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas.

A infusão de doadores de NO pelo período de 30 min diminuiu os efeitos vasoconstritores da fenilefrina (como demonstra o registro típico apresentado na Figura 4), efeito que perdurou por até 24 h após o término da infusão (Figura 8, painel A). Desta forma, 30 min após o fim da infusão de SNP ou SNAP, a vasoconstrição induzida pela fenilefrina, nas doses de 3, 10 e 30 nmol/kg,

apresentou uma redução de aproximadamente 80, 46 e 40%, respectivamente ($p < 0.05$, quando comparado às respostas obtidas em animais controle; Figura 5, painel A, esquerda). Resultados semelhantes foram obtidos 60 min após a infusão de SNP ou SNAP (Figura 5, painel B, esquerda). Embora um padrão de respostas similar possa ser observado 120 min após a infusão de SNAP, o mesmo não foi verificado nos animais infundidos com SNP, quando comparados aos animais infundidos apenas com PBS (Figura 5, painel C, esquerda). Além da fenilefrina, tanto a angiotensina I (Figura 5, painéis da direita) como a angiotensina II (dados não mostrados), também tiveram seus efeitos deprimidos pela infusão de SNP ou SNAP.

Em seguida, examinamos a influência das infusões de SNP ou SNAP sobre os efeitos de diferentes vasodilatadores (uma amina, um peptídeo, um nitrovasodilatador e um eicosanóide), e verificamos que a bradicinina e a acetilcolina tiveram suas ações potencializadas em mais de 60% trinta minutos após o término das infusões ($p < 0.05$, ANOVA seguida do teste t de Bonferroni), quando comparadas aos efeitos obtidos no grupo controle (Figura 6, painel A). Um padrão similar de respostas também foi observado 60 e 120 min após o período de infusão (Figura 6, painéis B e C). Mais ainda, as respostas à bradicinina permaneceram potencializadas por até 24 h após a infusão de SNP (Figura 8, painel B). Por outro lado, os efeitos hipotensores de concentrações crescentes de nitroprussiato de sódio e de iloprost, dois vasodilatadores endotélio-independentes, permaneceram inalterados após a infusão de SNP (Figura 7) ou SNAP (resultado não mostrado), em todos os tempos avaliados. A infusão de NAP não influenciou os efeitos de nenhum dos agentes vasoconstritores e vasodilatadores testados (resultados não mostrados).

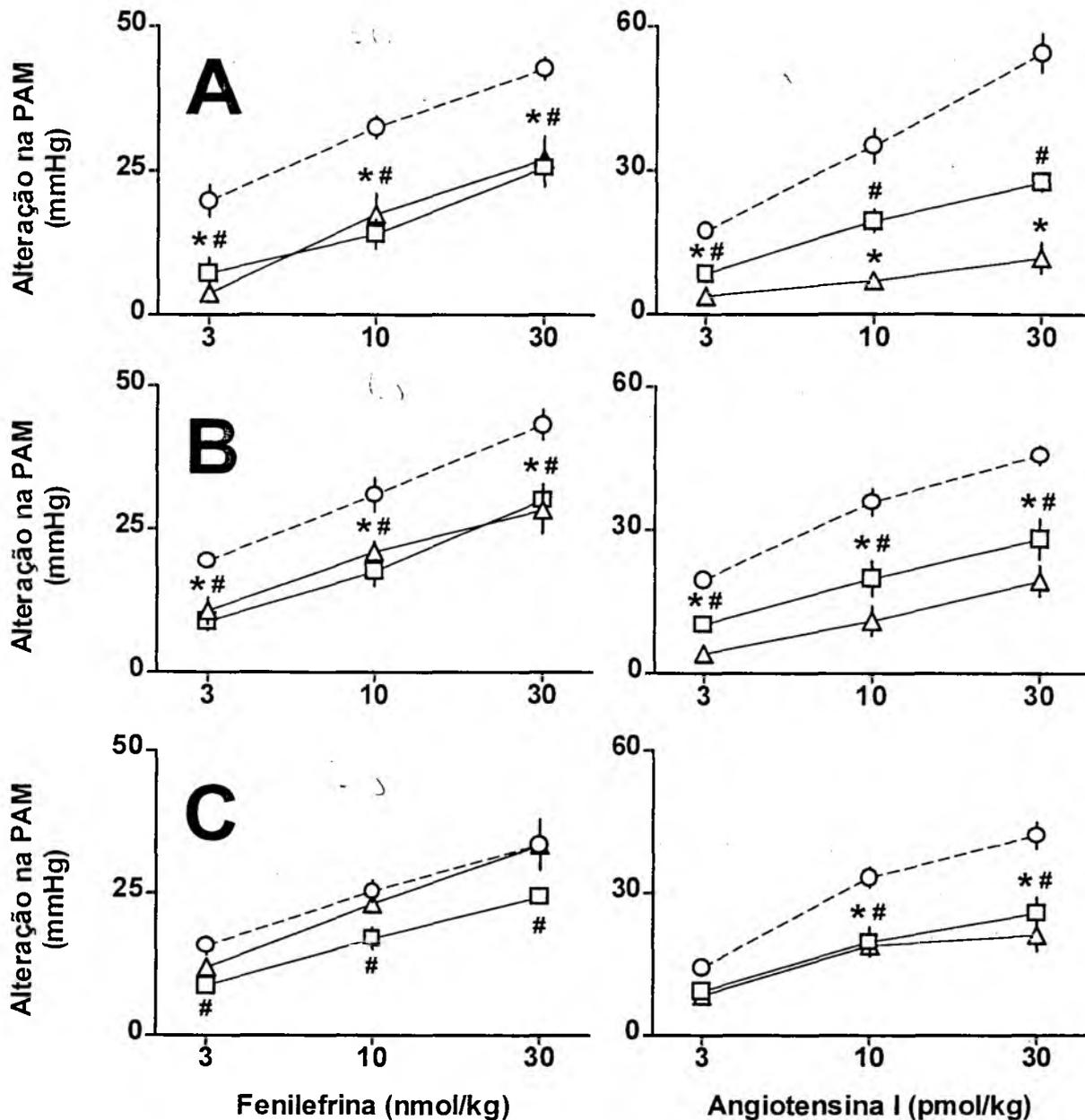


Figura 5: Efeitos da infusão de nitroprussiato de sódio ou S-nitroso-acetil-DL-penicilamina sobre a ação vasoconstritora da fenilefrina e da angiotensina I em ratos anestesiados. Curvas dose-resposta para a fenilefrina (esquerda) e para a angiotensina (direita) foram obtidas 30 (painel A), 60 (painel B) e 120 min (painel C) após o término do período de infusão (30 min) de PBS (20 μ l/min; círculos), SNP (250 nmol/kg/min; triângulos) ou SNAP (85 nmol/kg/min; quadrados). Para maiores detalhes ver a figura 4. Cada ponto representa a média \pm erro padrão da média de 4 a 7 animais. Onde não há barra de erro, esta foi encoberta pelo símbolo. * $p < 0.05$ para o grupo SNP versus o grupo PBS e # $p < 0.05$ para o grupo SNAP versus o grupo PBS (ANOVA seguida pelo teste t de Bonferroni). Após a infusão, os valores da PAM foram 95.7 ± 7.9 , 94.9 ± 8.6 e 107.6 ± 4.1 mmHg, para os animais que receberam PBS, SNP e SNAP, respectivamente.

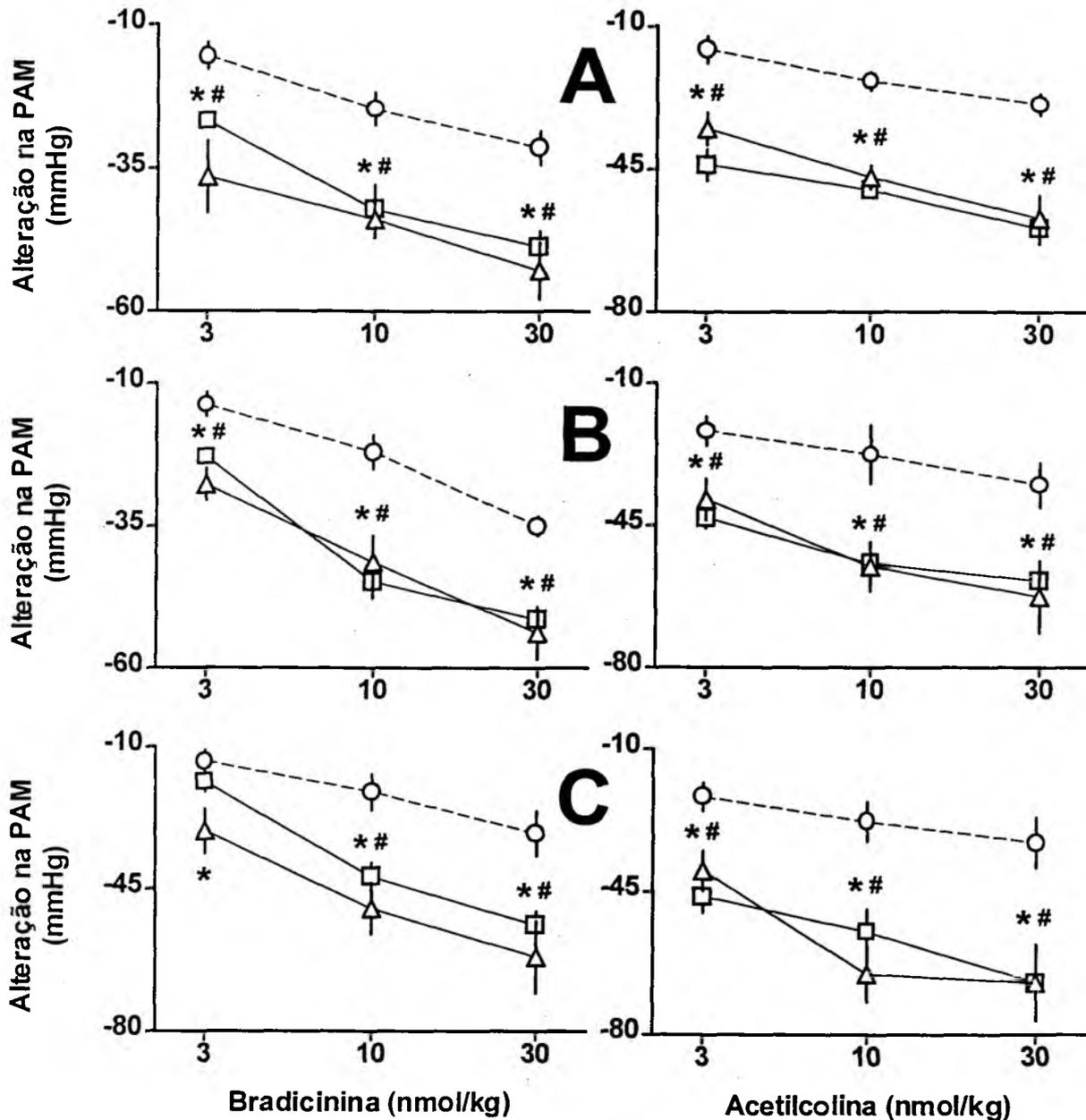


Figura 6: Efeitos da infusão de nitroprussiato de sódio ou S-nitroso-acetil-DL-penicilamina sobre a ação vasodilatadora da bradicinina e da acetilcolina em ratos anestesiados. Curvas dose-resposta para a bradicinina (esquerda) e para a acetilcolina (direita) foram obtidas 30 (painel A), 60 (painel B) e 120 min (painel C) após o término do período de infusão (30 min) de PBS (20 μ l/min; círculos), SNP (250 nmol/kg/min; triângulos) ou SNAP (85 nmol/kg/min; quadrados). Para maiores detalhes ver a figura 4. Cada ponto representa a média \pm erro padrão da média de 4 a 7 animais. Onde não há barra de erro, esta foi encoberta pelo símbolo. * $p < 0.05$ para o grupo SNP *versus* o grupo PBS e # $p < 0.05$ para o grupo SNAP *versus* o grupo PBS (ANOVA seguida pelo teste *t* de Bonferroni). Após a infusão, os valores da PAM foram 90.7 ± 7.9 , 101.9 ± 3.7 e 105.2 ± 3.9 mmHg, para os animais que receberam PBS, SNP e SNAP, respectivamente.

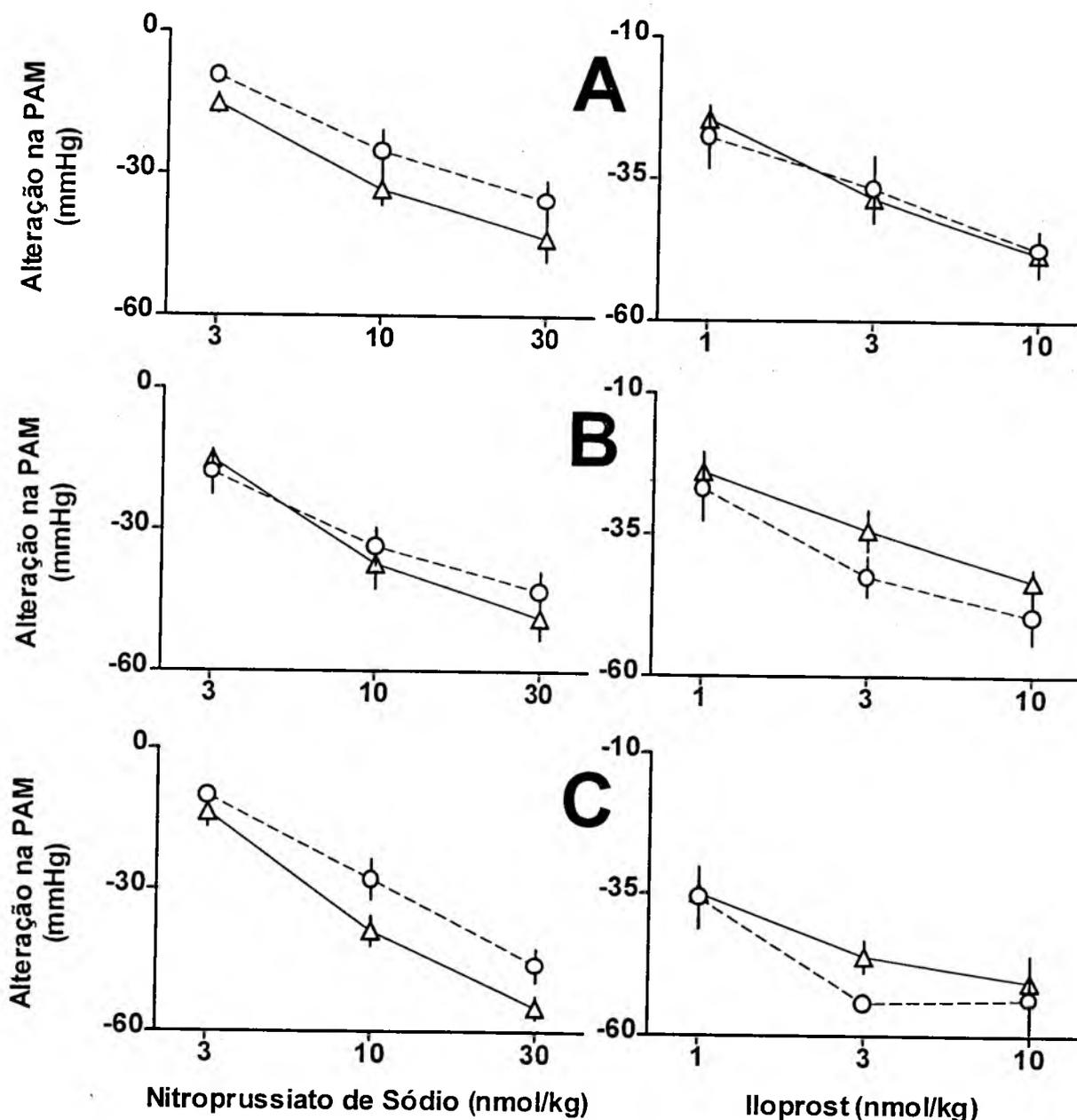


Figura 7: Efeitos da infusão de nitroprussiato de sódio sobre a ação vasodilatadora do próprio nitroprussiato de sódio e do iloprost em ratos anestesiados. Curvas dose-resposta para o nitroprussiato de sódio (esquerda) e para iloprost (direita) foram obtidas 30 (painel A), 60 (painel B) e 120 min (painel C) após o término do período de infusão (30 min) de PBS (20 μ l/min; círculos) ou SNP (250 nmol/kg/min; triângulos). Para maiores detalhes ver a figura 4. Cada ponto representa a média \pm erro padrão da média de 4 a 7 animais. Onde não há barra de erro, esta foi encoberta pelo símbolo. * $p < 0.05$ em relação ao grupo PBS (teste t de Student para amostras não pareadas). Após a infusão, os valores da PAM foram 101.7 ± 2.9 e 112.2 ± 5.4 mmHg, para os animais que receberam PBS e SNP, respectivamente.

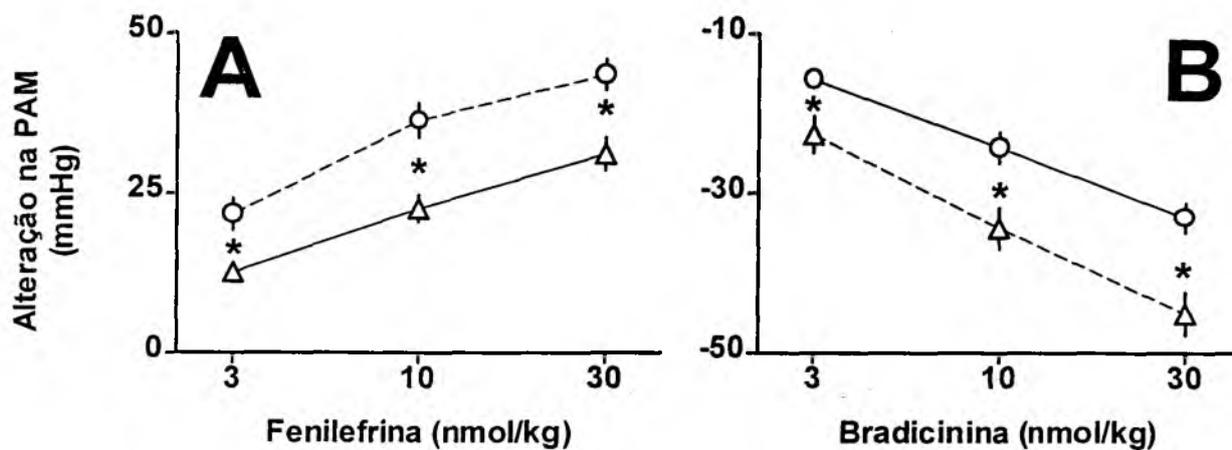


Figura 8: Responsividade vascular à fenilefrina e à bradicinina em ratos anestesiados, 24 h após a infusão de nitroprussiato de sódio. Doses crescentes de fenilefrina (A) e bradicinina (B) foram administradas 24 h após um período de infusão (30 min) de PBS (20 μ l/min) ou SNP (250 nmol/kg/min). Cada ponto representa a média \pm erro padrão da média de 4-7 animais. * $p < 0.05$ em relação ao grupo PBS (teste t de Student para amostras não pareadas).

4.3 Efeitos dos bloqueadores de canais de potássio

Após evidenciarmos que a infusão de doadores de NO é capaz de induzir alterações na responsividade vascular a vasoconstritores e a vasodilatadores, nós investigamos o envolvimento de canais de K⁺ neste fenômeno. Para isto, os efeitos diretos dos bloqueadores de canais de K⁺ sobre os parâmetros cardiovasculares analisados foram inicialmente quantificados. A administração de glibenclamida (40 µmol/kg) causou uma queda inicial (23.4 ± 4.0 mmHg, $n = 16$), seguida pela elevação sustentada (45.8 ± 3.4 mmHg, $n = 16$) da PAM, que foi acompanhada por um aumento na frequência cardíaca de 51 ± 5 bpm ($n = 16$). A eficácia da glibenclamida em inibir a atividade de canais de K⁺ sensíveis ao ATP foi avaliada em experimentos paralelos, através da administração de cromacalim, uma droga capaz de ativar tais canais de maneira específica. Nesses experimentos ($n = 4$), a vasodilatação induzida pelo cromacalim (5.3 ± 1.9 , 16.7 ± 2.7 e 35.4 ± 4.8 , para as doses de 10, 30 e 100 nmol/kg, respectivamente), foi totalmente abolida pela prévia administração de glibenclamida (40 µmol/kg).

Ambos, TEA (360 µmol/kg; $n = 15$) e 4-aminopiridina (1 µmol/kg; $n = 14$), aumentaram transitoriamente a PAM em 43.4 ± 3.6 mmHg e 26.6 ± 6.6 mmHg, respectivamente, mas não alteraram a frequência cardíaca dos animais. Diferente dos efeitos da glibenclamida, que persistiram durante períodos maiores que 30 min, os efeitos do TEA e da 4-aminopiridina sobre a PAM e a frequência cardíaca perduraram apenas 10 a 20 min. Apenas a glibenclamida foi capaz de atenuar (entre 30 a 40%), a hipotensão associada à infusão de SNP (resultado não mostrado). Ao menos nas doses utilizadas, nenhum dos bloqueadores de canais de K⁺ utilizados causou qualquer modificação na responsividade à fenilefrina (Tabela

4) ou à bradicinina (Tabela 5) nos animais controle, mesmo quando administrados poucos minutos (5-10 min) antes destas drogas (dados não mostrados).

Tabela 4: Efeitos do pré-tratamento com bloqueadores de canais de potássio sobre a responsividade vascular à fenilefrina em ratos anestesiados infundidos com PBS ou nitroprussiato de sódio.

Tratamento ^a (i.v.)	Aumento da Pressão Arterial Média (mmHg) ^b			
	PBS (20 µl/min)		SNP (250 nmol/kg/min)	
	Antes	Após	Antes	Após
Veículo	42.7 ± 5.4	42.7 ± 1.9	43.9 ± 3.7	27.0 ± 3.9*
Glibenclamida (40 µmol/kg)	43.8 ± 2.7	38.2 ± 1.2	41.9 ± 5.3	25.2 ± 5.2*
4-aminopiridina (1 µmol/kg)	45.5 ± 2.1	43.0 ± 3.1	46.7 ± 2.8	41.1 ± 3.9
Tetraetilamónio (360 µmol/kg)	39.8 ± 3.2	42.0 ± 3.8	39.9 ± 2.4	36.5 ± 6.1

^a Os bloqueadores de canais de K⁺ ou veículos (DMSO para a glibenclamida ou PBS) foram administrados i.v. 10 min antes do início da infusão de PBS ou SNP.

^b Os valores representam os efeitos vasoconstritores da fenilefrina (30 nmol/kg, i.v.) antes ou após o período de 30 min de infusão de PBS ou SNP. Os resultados expressam a média ± erro padrão da média de 4 a 6 animais por grupo. * $p < 0.05$ em relação ao efeito correspondente antes da infusão de SNP (teste *t* de Student para amostras pareadas).

Tabela 5: Efeitos do pré-tratamento com bloqueadores de canais de potássio sobre a responsividade vascular à bradicinina em ratos anestesiados infundidos com PBS ou nitroprussiato de sódio.

Tratamento ^a (i.v.)	Redução da Pressão Arterial Média (mmHg) ^b			
	PBS (20 µl/min)		SNP (250 nmol/kg/min)	
	Antes	Após	Antes	Após
Veículo	37.0 ± 4.8	31.4 ± 2.9	33.3 ± 5.3	52.8 ± 5.0*
Glibenclamida (40 µmol/kg)	30.1 ± 2.5	39.4 ± 3.9	34.2 ± 4.5	56.4 ± 1.9*
4-aminopiridina (1 µmol/kg)	34.8 ± 3.4	39.7 ± 2.9	30.5 ± 2.7	38.8 ± 5.8
Tetraetilamônio (360 µmol/kg)	33.7 ± 4.6	40.0 ± 5.3	34.5 ± 4.1	40.5 ± 6.5

^a Os bloqueadores de canais de K⁺ ou veículos (DMSO para a glibenclamida ou PBS) foram administrados i.v. 10 min antes do início da infusão de PBS ou SNP.

^b Os valores representam os efeitos vasodilatadores da bradicinina (30 nmol/kg, i.v.) antes ou após o período de 30 min de infusão de PBS ou SNP. Os resultados expressam a média ± erro padrão da média de 4 a 6 animais por grupo. * $p < 0.05$ em relação ao efeito correspondente antes da infusão de SNP (teste *t* de Student para amostras pareadas).

As alterações nos efeitos da fenilefrina e da bradicinina, induzidas pela infusão de SNP, foram totalmente prevenidas pela administração de TEA e 4-aminopiridina antes da infusão deste doador de NO (Figura 9, painéis A e B, respectivamente). Entretanto, o tratamento com glibenclamida, antes da infusão de SNP, não alterou a ação deste doador de NO sobre os efeitos da fenilefrina e da bradicinina (Figura 9, painel C).

Por sua vez, os resultados obtidos quando os bloqueadores de canais de K⁺ foram administrados após a infusão de SNP mostraram um quadro bastante diferente. Nestes experimentos, a capacidade da infusão de SNP em modificar o padrão das respostas à fenilefrina ou à bradicinina foi testada antes da administração dos bloqueadores de canais de K⁺ (Figura 10, quadrados). Nestas condições, apenas o TEA foi capaz de reverter, ao menos em parte, os efeitos da infusão de SNP sobre a atividade da fenilefrina (Figura 10, painel A, esquerda), mesmo quando administrada 24 h após a infusão deste doador de NO (Figura 11). Ao contrário de quando foi utilizada antes da infusão SNP, a administração de 4-aminopiridina não alterou a redução dos efeitos da fenilefrina quando administrada após a infusão de SNP (Figura 10, painel B, esquerda). Por outro lado, a utilização tanto de TEA como de 4-aminopiridina, após a infusão de SNP, atenuou a potencialização da resposta vasodilatadora às baixas doses de bradicinina (3 nmol/kg), mas não influenciou as respostas às doses maiores deste vasodilatador (Figura 10, painéis A e B, direita). A exemplo de quando utilizada antes da infusão de SNP, a glibenclamida foi incapaz de restaurar as respostas da fenilefrina e da bradicinina para níveis normais, quando utilizada após o período de infusão (Figura 10, painel C). Finalmente, a administração de DMSO (200 µl), o veículo utilizado para dissolver a glibenclamida, não influenciou nenhum dos parâmetros avaliados (dados não mostrados).

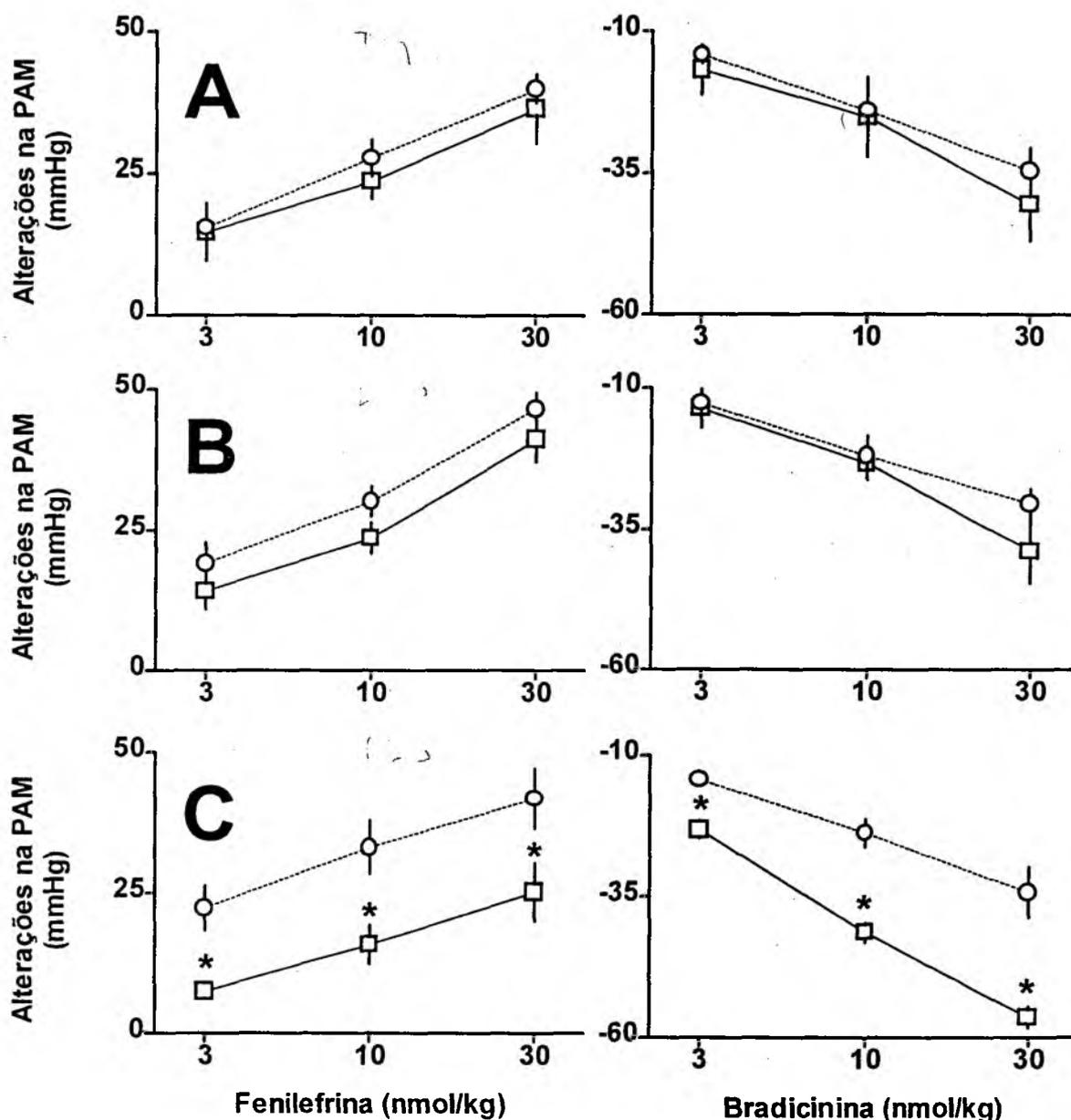


Figura 9: Efeitos da administração dos bloqueadores de canais de potássio, antes da infusão de SNP, sobre a responsividade vascular à fenilefrina e à bradycinina em ratos anestesiados. Após a obtenção de uma curva dose-resposta à fenilefrina (círculos; esquerda) ou à bradycinina (círculos; direita), tetraetilamônio (360 $\mu\text{mol/kg}$, i.v.; painel A), 4-aminopiridina (1 $\mu\text{mol/kg}$, i.v.; painel B) ou glibenclamide (40 $\mu\text{mol/kg}$, i.v.; painel C) foram administradas lentamente (5-10 min). Após a restabilização da PAM em valores próximos aos basais, uma infusão de SNP (250 nmol/kg/min) durante 30 min foi implementada. Terminada a infusão e respeitado um período de recuperação de 30 min para o retorno da PAM para níveis normais, uma nova curva dose-resposta para a fenilefrina (quadrados; esquerda) ou para a bradycinina (quadrados; direita) foi obtida. Cada ponto representa a média \pm erro padrão da média de 4-8 experimentos. * $p < 0.05$, em relação ao efeito correspondente obtido antes da administração dos bloqueadores de canais de potássio e da infusão de SNP (teste t de Student para amostras pareadas).

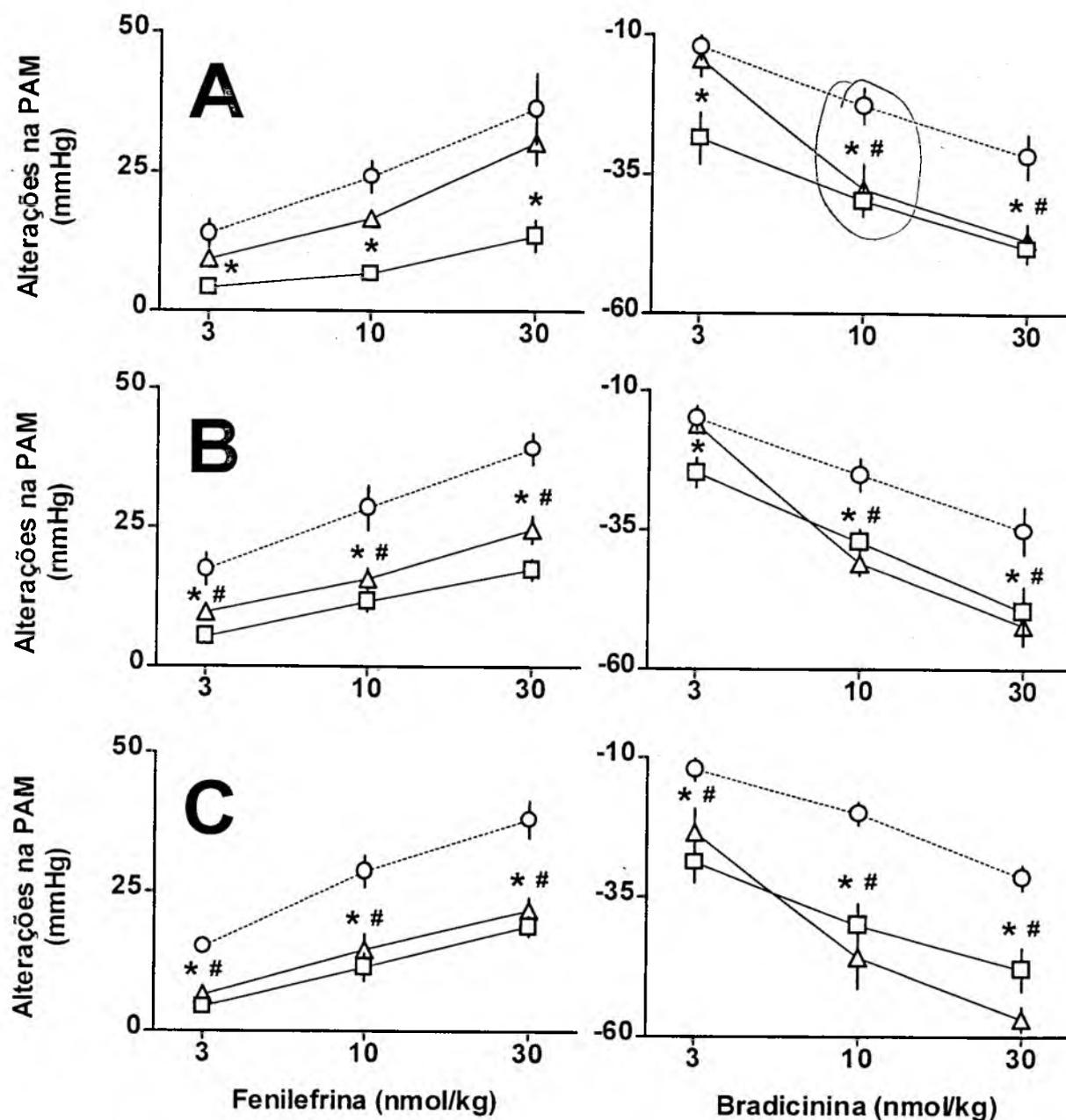


Figura 10: Efeitos da administração de bloqueadores de canais de potássio, após a infusão de nitroprussiato de sódio, sobre a responsividade vascular à fenilefrina e à bradicinina em ratos anestesiados. Após a obtenção de uma curva dose resposta à fenilefrina (círculos; esquerda) ou à bradicinina (círculos; direita), uma infusão de SNP (250 nmol/kg/min) durante 30 min foi implementada. Para confirmar os efeitos do SNP sobre a responsividade vascular, uma nova curva dose-resposta para a fenilefrina ou para a bradicinina foi obtida (quadrados). Finalmente, tetraetilamônio (360 μ mol/kg, i.v.; painel A), 4-aminopiridina (1 μ mol/kg, i.v.; painel B) ou glibenclamida (40 μ mol/kg, i.v.; painel C) foram administradas lentamente, e uma nova curva dose resposta à fenilefrina ou à bradicinina obtida (triângulos). Cada ponto representa a média \pm erro padrão da média de 4-8 animais. * $p < 0.05$ comparando os resultados obtidos antes (círculos) e após a infusão de SNP (quadrados); # $p < 0.05$ comparando os resultados obtidos antes da infusão de SNP (círculos) e após a infusão de SNP e o tratamento com os bloqueadores de canais de K⁺ (triângulos) (ANOVA seguida do teste *t* de Bonferroni).

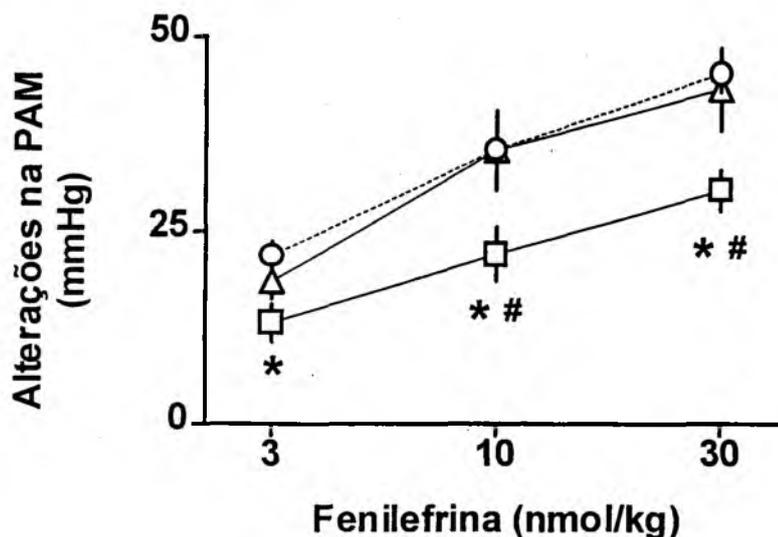


Figura 11: Influência do tetraetilamônio sobre os efeitos vasoconstritores da fenilefrina em ratos anestesiados, 24 h após a infusão de SNP. Os animais receberam uma infusão de SNP (250 nmol/kg/min) durante 30 min, 24 h antes da realização do experimento. Após o registro de uma curva dose-resposta à fenilefrina (quadrados), tetraetilamônio (360 μ mol/kg; i.v.) foi administrada lentamente. Respeitado um intervalo de 10-20 min para restabilização da PAM em valores próximos aos verificados antes da administração do bloqueador de canais de potássio, uma nova curva dose-resposta para a fenilefrina foi obtida. Para uma melhor análise, os efeitos da fenilefrina em animais controle, infundidos com PBS (20 μ l/min) 24 h antes do experimento, estão ilustrados na figura (círculos). Cada ponto representa a média \pm erro padrão da média de 4-8 experimentos. * $p < 0.05$ entre os resultados da primeira curva dose-resposta obtida em animais infundidos com SNP (quadrados) e PBS (círculos), (teste t de Student para amostras não pareadas); # $p < 0.05$ entre os efeitos da fenilefrina nos animais infundidos com SNP antes (quadrados) e após o tratamento com tetraetilamônio (triângulos), (teste t de Student para amostras pareadas).

V – Discussão

Os principais achados deste trabalho podem ser resumidos como: i) a infusão de doadores de NO em ratos anestesiados induz um estado de profunda hiporresponsividade a vasoconstritores (fenilefrina, angiotensina I e angiotensina II), similar ao observado em ratos pré-tratados com LPS; ii) a exposição a doadores de NO potencializa as respostas vasodilatadoras a agentes endotélio-dependentes (acetilcolina e bradicinina), mas não altera os efeitos de vasodilatadores endotélio-independententes (iloprost e nitroprussiato de sódio); iii) as alterações na responsividade vascular à fenilefrina e à bradicinina, induzidas pela infusão de doadores de NO, persistem por pelo menos 24 h, período muito maior que a meia vida do NO (cerca de 5 a 10 segundos); iv) o bloqueio de canais de K^+ com TEA ou, mais especificamente, de canais de K^+ voltagem-dependentes com 4-aminopiridina, *antes* da infusão dos doadores de NO, praticamente aboliu as alterações nas respostas vasculares à fenilefrina e à bradicinina; v) a administração de 4-aminopiridina *após* a infusão dos doadores de NO não foi capaz de normalizar as respostas vasculares à fenilefrina e à bradicinina, enquanto o TEA reverteu a hiporresponsividade à fenilefrina mas não a hiper-responsividade a doses elevadas de bradicinina.

A hiporreatividade vascular a vasoconstritores, uma das principais características do choque séptico (Groeneveld & Thijs, 1986), é atribuída à excessiva produção de NO, uma vez que a inibição da NOS, enzima responsável pela produção deste mediador, pode reverter ou aliviar este fenômeno tanto em

humanos como em animais (Kilbourn *et al.*, 1990; Gray *et al.*, 1991; Klabunde & Ritger, 1991; Wright *et al.*, 1992; Petros *et al.*, 1994; Cai *et al.*, 1996). Este excesso de NO, derivado principalmente da isoforma induzida da iNOS, vem sendo apontado como o principal responsável pela profunda falência do sistema cardiovascular, que pode culminar com a falência múltipla de órgãos e morte (para revisão ver Marín & Rodríguez-Martínez, 1997).

Neste trabalho, buscando melhor compreender a real participação do NO nas alterações da responsividade vascular existentes durante o choque séptico, avaliamos os efeitos da infusão de doadores de NO sobre a reatividade vascular sistêmica a agentes vasoconstritores e vasodilatadores. Embora Katsuki *et al.* (1977) tenham descrito uma responsividade diminuída para vasoconstritores *durante* a infusão de SNP, em nosso modelo experimental a responsividade vascular foi avaliada *após* o término da infusão do SNP. Como nossos resultados demonstraram, este modelo experimental reduziu os efeitos vasoconstritores da fenilefrina, da angiotensina I e da angiotensina II. Além disso, uma potencialização dos efeitos vasodilatadores de substâncias endotélio-dependentes (acetilcolina e bradicinina), também foi verificada após a exposição do sistema cardiovascular aos doadores de NO. Como estas alterações na responsividade vascular foram similares às aquelas observadas em animais pré-tratados com LPS (Figuras 2 e 3), esta metodologia permitiu-nos investigar a relação entre a excessiva produção de NO, a reduzida responsividade a agentes vasoconstritores e a potencialização do efeito de substâncias vasodilatadoras, existentes em animais endotoxêmicos, sem o envolvimento de uma pletera de outros mediadores com ações cardiovasculares, também liberados em resposta ao LPS.

Embora tenhamos testado altas doses de SNP (até 1000 nmol/kg/min) durante períodos de até 120 min (resultados não mostrados), nós optamos por utilizar a dose de 250 nmol/kg/min durante 30 min, uma vez que a hipotensão induzida por este tratamento é reprodutível e totalmente revertida após o término da infusão, indicando que os animais não desenvolvem uma falência hemodinâmica (Figura 4). A dose de 85 nmol/kg/min de SNAP foi selecionada por causar efeitos cardiovasculares idênticos àqueles induzidos pelo SNP. Como ambos, SNP e SNAP apresentaram os mesmos efeitos sobre a responsividade vascular à diferentes substâncias vasoativas, é pouco provável que estes efeitos sejam decorrentes de eventos inespecíficos mediados por estes doadores de NO. Mais ainda, a infusão de N-acetil-penicilamina, a molécula que após um processo de nitrosilação origina o SNAP, não modificou o padrão de respostas de nenhum dos agentes vasoconstritores ou vasodilatadores utilizados neste estudo. Desta forma, nós assumimos que os resultados até aqui mostrados advêm de uma atividade direta do NO sobre mecanismos envolvidos na regulação da responsividade do músculo liso vascular.

A infusão de doadores de NO causou, como esperado, uma profunda vasodilatação e queda da PAM dos animais. Em todos os experimentos, consideramos que a formação de NO foi interrompida com o término do período de infusão, desde que a PAM retornava rapidamente (5-10 min) aos valores basais determinados no início dos experimentos. Curiosamente, a infusão de SNP ou SNAP não alterou a frequência cardíaca dos animais. O estado anestésico é uma das possíveis explicações para a ausência de taquicardia durante a hipotensão induzida pelos doadores de NO, pois nestas condições todos os reflexos simpáticos e

parassimpáticos encontram-se, ao menos em parte, suprimidos. Por outro lado, embora nossos resultados não permitam maiores conclusões, a possibilidade de que a explicação para este fato esteja relacionada a uma atividade depressora direta do NO sobre a contratilidade cardíaca precisa ser considerada e está sendo avaliada em nosso laboratório.

Possivelmente, a razão pela qual não encontramos altas concentrações de NO_x no plasma e na urina dos animais infundidos com doadores de NO se deve à pequena quantidade de NO efetivamente liberada. Como foi descrito anteriormente (Tabela 3), a concentração basal de NO_x presente no plasma de ratos tratados apenas com PBS é cerca de 35 μM, enquanto as doses de doadores de NO utilizadas variaram de 85 a 250 nmol/kg/min, quantidades que podem ter sido insuficientes para modificar significativamente as concentrações plasmáticas basais de NO_x.

Talvez a mais importante contribuição deste estudo seja que uma exposição relativamente breve a doadores de NO (e conseqüentemente a pequenas quantidades de NO) é suficiente para tornar o sistema vascular de ratos hiporresponsivo a vasoconstritores e hiper-responsivo a vasodilatadores endotélio-dependentes, como acontece durante o choque endotoxêmico. Isto sugere que, durante este quadro patológico, a ação de pequenas quantidades de NO diretamente sobre o sistema cardiovascular pode ser suficiente para gerar o quadro de hiporreatividade a vasoconstritores. Mais ainda, como no nosso modelo a refratariedade a vasoconstritores foi verificada após o término da infusão dos doadores de NO, quando os valores da pressão arterial já haviam retornado aos parâmetros normais, torna-se evidente que a contínua produção de NO (pela iNOS)

e/ou a queda da pressão arterial e conseqüente falência do sistema cardiovascular, não são eventos primários ou essenciais para a origem da hiporresponsividade a vasoconstritores durante o choque séptico. Prova disto é que mesmo 24 h após a infusão de SNP, as alterações na responsividade vascular permaneceram significativas (Figura 8).

Outra importante informação fornecida pelo nosso modelo foi que, além de uma resposta diminuída a vasoconstritores, os animais expostos a doadores de NO exibiram também uma responsividade vascular elevada á acetilcolina e à bradicinina, dois vasodilatadores endotélio-dependentes.

O papel da bradicinina no choque séptico tem sido objeto de várias investigações, porém permanece controverso. Embora existam trabalhos descrevendo uma potencialização dos efeitos vasodilatadores da bradicinina em animais endotoxêmicos (por exemplo Waller *et al.*, 1994), a administração de antagonistas de receptores bradicinérgicos tem sido descrita como benéfica (Weipert *et al.*, 1988; Wilson *et al.*, 1989; Paya & Stoclet, 1995) ou ineficaz (Janssen *et al.*, 1987; Berg *et al.*, 1989) para o tratamento de sintomas cardiovasculares do choque endotoxêmico. Por sua vez, receptores do tipo B₁, os quais são induzidos durante processos inflamatórios (para revisão ver Marceau, 1995), também parecem ter um importante papel sobre os efeitos vasodilatadores da bradicinina em ratos tratados com LPS, uma vez que o agonista seletivo de receptores B₁, des-Arg⁹-bradicinina, é capaz de induzir vasodilatação pronunciada nestes animais (Tokumasu *et al.*, 1995). Entretanto, no nosso modelo experimental, a potencialização dos efeitos vasodilatadores da bradicinina não ocorreu em virtude da indução de receptores do tipo B₁, desde que até 24 h após a infusão dos doadores

de NO, a administração de doses crescentes de des-Arg⁹-bradicinina (até 50 nmol/kg, i.v.), não causou qualquer modificação na pressão arterial dos animais (resultados não mostrados).

O sistema de contato de coagulação é ativado durante o choque séptico e uma das consequências de sua ativação é o aumento dos níveis plasmáticos de bradicinina (Fink, 1998; para revisão ver Brandtzaeg, 1996). Embora mais de 95% da bradicinina liberada seja inativada durante a primeira passagem pelos pulmões (Freer & Stewart, 1975), principalmente pela ação da enzima conversora da angiotensina (ou cininase II), nossos resultados indicam que mesmo as pequenas quantidades de bradicinina que escapam da inativação podem ser importantes durante o choque séptico, uma vez que seus efeitos são potencializados, durante longos períodos, pelo NO. Isto sugere uma importante contribuição desta cinina para a progressiva queda da pressão arterial existente nesta condição patológica.

Uma possível explicação para a potencialização dos efeitos da bradicinina poderia ser um efeito inibitório do NO sobre a atividade da enzima conversora da angiotensina. Embora existam trabalhos descrevendo a inibição da atividade da enzima conversora da angiotensina pelo SNP em experimentos *in vitro* (Park & Means, 1988; Ackermann *et al.*, 1998) e em artéria carótida de rato *ex vivo* (Ackermann *et al.*, 1998), em nossos experimentos (*in vivo*), ao menos para as doses de SNP ou SNAP administradas, esta possibilidade pode ser descartada, uma vez que os efeitos da angiotensina I e da angiotensina II permaneceram idênticos antes e após a infusão dos doadores de NO, sugerindo que a atividade da enzima conversora da angiotensina permaneceu inalterada. Além disso, a potencialização dos efeitos vasodilatadores da acetilcolina, cujos efeitos vasodilatadores

independem da atividade da cininase II, é mais um forte indício para a ausência de participação desta enzima nas alterações da responsividade vascular a agentes vasodilatadores endotélio-dependentes induzidas pela infusão de doadores de NO.

Dados da literatura mostram que a expressão da iNOS após o tratamento com LPS ou bactérias apresenta diferentes características, no que se refere ao intervalo necessário para a indução e ao período cuja expressão permanece detectável, de acordo com o tipo de animal e/ou tecido analisado (Knowles *et al.*, 1990; Salter *et al.*, 1991; Cunha *et al.*, 1994; Rees *et al.*, 1995). Por exemplo, a expressão de iNOS em diferentes tecidos de rato atinge seu ápice 4 a 6 horas após a administração de LPS, decaindo a níveis muito baixos dentro de 24 horas (Knowles *et al.*, 1990; Salter *et al.*, 1991). Ainda assim, a administração de LPS em ratos anestesiados induz um estado de hiporresponsividade à fenilefrina (Tabela 1), acompanhado por uma potencialização das respostas à bradicinina (Tabela 2), o qual persiste por pelo menos 24 horas. Além do mais, utilizando um modelo de infusão de LPS para reproduzir a fase de hiperdinâmica circulatória do choque séptico, Gardiner *et al.* (1995), sugeriram que i) a atividade da iNOS é temporariamente dissociada da vasodilatação existente em ratos 24 h após o início da infusão de LPS e ii) o tratamento com L-NAME (um inibidor da NOS), não reverte os efeitos cardiovasculares do LPS. Em conjunto com os resultados obtidos em animais infundidos com doadores de NO, estas observações sugerem que os efeitos do NO sobre a responsividade vascular constituem um evento precoce no choque séptico. Uma vez que o sistema cardiovascular é exposto a quantidades de NO acima dos valores fisiológicos (seja através da infusão de doadores de NO, seja através da indução de iNOS pelo LPS), a responsividade vascular às substâncias

vasoativas é alterada durante longos períodos, o que pode explicar, ao menos em parte, porque agentes vasoconstritores são ineficientes, especialmente nos estágios tardios do choque séptico.

Outro importante ponto explorado pelo nosso trabalho refere-se aos mecanismos através dos quais o NO altera a responsividade vascular a vasoconstritores e a vasodilatadores endotélio-dependentes. Na musculatura lisa vascular, a ativação de canais de K⁺ causa hiperpolarização da membrana, redução do influxo de Ca²⁺ e relaxamento vascular (Okabe *et al.*, 1987). Alguns trabalhos da literatura, os quais utilizam técnicas de *patch-clamp*, sugerem que o NO é capaz de modular, diretamente, a atividade de canais de K⁺ ativados por cálcio (Bolotina *et al.*, 1994; Mistry & Garland, 1998). Nossos resultados, obtidos através do uso de drogas bloqueadoras de canais de K⁺, indicam que o mecanismo pelo qual a infusão de doadores de NO afeta a responsividade vascular envolve, ao menos em parte, canais de K⁺.

Enquanto nenhum dos bloqueadores de canais de K⁺ utilizados neste estudo alterou os efeitos da fenilefrina ou da bradicinina em animais controle (infundidos apenas com PBS; Tabelas 4 e 5), a administração de TEA (um bloqueador inespecífico de canais de K⁺), ou 4-aminopiridina (um bloqueador seletivo para canais de K⁺ voltagem-dependentes), *antes* da infusão de SNP, preveniu o aparecimento da hiporresponsividade à fenilefrina, bem como a potencialização dos efeitos da bradicinina (Figura 9). Por sua vez, a administração de glibenclamida (um bloqueador seletivo para canais de K⁺ sensíveis ao ATP), foi ineficaz em prevenir os efeitos do NO sobre a responsividade vascular. Baseados nestes resultados, poderíamos concluir que a abertura de canais de K⁺ voltagem-dependentes é

responsável por todos os efeitos do NO sobre a responsividade vascular. Entretanto, os resultados obtidos quando os bloqueadores de canais de K⁺ foram administrados após a infusão do SNP, e portanto, após a instalação das alterações na responsividade vascular, sugerem um quadro mais complexo (Figura 10). Nestas condições, apenas o TEA foi capaz de reverter a hiporresponsividade à fenilefrina, enquanto ambos, 4-aminopiridina e glibenclamida, não apresentaram quaisquer efeitos. Talvez mais importante seja que, mesmo 24 h após a infusão de SNP, quando as respostas à fenilefrina permaneciam reduzidas, a administração de TEA foi capaz de reverter totalmente a hiporresponsividade a este vasoconstritor. Estes resultados indicam que uma subpopulação de canais de K⁺ sensíveis ao TEA, mas não à 4-aminopiridina ou à glibenclamida, é importante para a manutenção dos prolongados efeitos dos doadores de NO sobre a vasoconstrição induzida pela fenilefrina.

Embora a potencialização dos efeitos da bradicinina seja totalmente bloqueada pela administração de TEA ou 4-aminopiridina antes da infusão de SNP (Figura 9), a administração destes bloqueadores de canais de K⁺ após a infusão de SNP foi ineficaz em bloquear a hiporresponsividade à bradicinina, exceto quando foram utilizadas doses pequenas deste peptídeo (3 nmol/kg; Figura 10). Isto pode ser um indicativo de que, após a exposição ao NO, as respostas vasculares desencadeadas por baixas doses de bradicinina dependem da abertura de canais de K⁺, enquanto os efeitos induzidos por doses maiores deste agonista envolvem algum outro mecanismo.

Enquanto a bradicinina e a acetilcolina, dois vasodilatadores endotélio-dependentes, tiveram seus efeitos potencializados após a infusão dos doadores de

NO, o mesmo não aconteceu com os efeitos do iloprost e do SNP, ambos endotélio-independententes. Embora os nossos resultados não permitam maiores esclarecimentos acerca desta seletividade de potencialização para substâncias vasodilatadoras endotélio-dependentes, uma possível explicação para esta diferença seria que as alterações induzidas pelo NO, que levam à potencialização dos efeitos da bradicinina e da acetilcolina, ocorrem nas células endoteliais. O NO poderia, por exemplo, modificar a disponibilidade de receptores ou segundos mensageiros envolvidos na transdução de sinal, ou ainda alterar a liberação de substâncias derivadas do endotélio, como o próprio NO ou o EDHF. Nesse sentido, Buga *et al.* (1993) mostraram que o NO é capaz de regular, através de um mecanismo de retroalimentação negativa, a produção de NO pela eNOS. Por outro lado, Bauersachs *et al.* (1996) demonstraram que, ao menos sob condições fisiológicas, a produção de EDHF é diminuída pela ação do NO. Logo, se o NO gerado pelos doadores de NO estivesse inibindo a atividade da eNOS, isto poderia resultar em uma maior liberação de EDHF, hiperpolarização e facilitação das respostas vasodilatadoras. Entretanto é pouco provável que esta seja a explicação para o fenômeno de hiper-responsividade apenas para agentes endotélio-dependentes, uma vez que a hiperpolarização do músculo liso vascular facilitaria também a vasodilatação à substâncias endotélio-independententes. Além do mais, modificações na produção basal de NO teriam efeitos diretos sobre a pressão arterial, o que não aconteceu, visto que imediatamente após o término da infusão dos doadores de NO, a PAM prontamente retornava para valores próximos aos normais (Figura 4).

Nossos resultados não explicam porque uma breve exposição ao NO pode causar alterações prolongadas na sensibilidade a vasodilatadores e

vasoconstritores. Entretanto, a presença de grupamentos sulfidrílicos e resíduos de cisteína nos domínios regulatórios dos canais de K⁺ tem sido sugerida como vital para o funcionamento destes canais (Rusppersberg *et al.*, 1991; Islam *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1997). Considerando-se que o NO é altamente reativo com grupamentos sulfidrílicos, a possibilidade de que o NO possa estar interagindo com os grupos -SH dos canais de K⁺, causando a abertura dos mesmos, precisa ser considerada. Abderrahmane *et al.* (1998) sugerem que o NO é capaz de aumentar a probabilidade de abertura de canais de K⁺ ativados por cálcio através de um mecanismo de nitrotiosilação.

Outra possível explicação para o efeito prolongado da infusão de NO sobre a sensibilidade vascular pode ser a formação de S-nitrosotióis (RSNO) intracelulares, grupamentos que são formados através da reação do NO com tíois intracelulares (como o glutationa). Desde que a existência natural dos RSNO foi demonstrada *in vivo* (Gaston *et al.*, 1993), a importância fisiológica destes grupamentos vem sendo intensamente estudada. Estes compostos podem sofrer clivagem homolítica da ligação S-N, o que resulta na liberação de moléculas de NO (para revisão ver Stamler, 1994). Recentemente, Davisson *et al.* (1996) demonstraram que os efeitos da bradicinina e da acetilcolina sobre a pressão arterial de ratos anestesiados, tratados com inibidores da NOS, ocorre através da liberação de NO de estoques intracelulares de RSNO. Portanto, se a infusão de doadores de NO aumentar os estoques de RSNO nas células endoteliais e se estes estoques liberarem NO continuamente, ou mais especificamente, quando da administração de agentes vasoativos, isto poderia explicar, ao menos em parte: i) a razão pela qual apenas vasodilatadores endotélio-dependentes têm seus efeitos potencializados após a

infusão de doadores de NO e ii) a prolongada hiporresponsividade a vasoconstritores e hiper-sensibilidade a vasodilatadores endotélio-dependentes. Logo, a liberação de NO de estoques intracelulares de RSNO poderia, por sua vez, aumentar a probabilidade de abertura de canais de K⁺, causando hiperpolarização. Nós investigamos a existência de RSNO no plasma dos animais infundidos com SNAP ou SNP, mas encontramos pouco ou nenhum indício de RSNO (resultados não mostrados). Embora este resultado inicialmente indique que o NO liberado pelos doadores não esteja sendo estocado na forma de compostos RSNO, o sangue parece não ser um bom reservatório destes grupamentos (Butler & Rhodes, 1997). Logo, somente uma análise direcionada à quantificação de grupamentos RSNO em diferentes tecidos e sistemas orgânicos de animais infundidos com doadores de NO poderá fornecer dados que nos permitam descartar ou confirmar alterações quantitativas e funcionais acerca do envolvimento dos estoques intracelulares de RSNO no nosso modelo experimental, bem como no choque séptico propriamente dito.

Nós investigamos também o envolvimento da guanilato ciclase solúvel nas alterações da responsividade vascular induzidas pelo NO, mas os inibidores da guanilato ciclase, azul de metileno e 1H-[1,2,4]-oxadiazolo-[4,3-a]-quinoxalin-1 (ODQ), não alteraram as respostas vasculares ao SNP, ao SNAP, à acetilcolina, à bradicinina ou à fenilefrina, tanto nos animais infundidos com doadores de NO, como naqueles tratados apenas com PBS (dados não mostrados). Estes resultados podem indicar que os efeitos dos doadores de NO sobre a responsividade vascular não estão relacionados à ativação da guanilato ciclase. Em experimentos com *patch-clamp*, o NO é capaz de agir diretamente sobre canais de K⁺, ativando-os (Bolotina

et al., 1994; Mistry & Garland, 1998), o que torna possível que também *in vivo* o NO possa estar agindo diretamente sobre estes canais. Entretanto, baseados em experimentos com tecidos inteiros (artéria pulmonar de rato), associados ao *patch-clamp* de células inteiras (*whole cell*), outros autores sugerem que os efeitos do NO sobre canais de K⁺ ativados por cálcio é mediado pela ativação de proteínas quinases dependentes de GMPc (por exemplo, Archer *et al.*, 1994). Frente a estes resultados, é possível que os inibidores da guanilato ciclase tenham sido ineficientes em inibir a atividade desta enzima *in vivo*, devido a aspectos farmacocinéticos ou à complexidade inerente ao modelo de pressão arterial.

Os resultados aqui descritos indicam que a infusão de doadores de NO induz alterações na responsividade vascular a vasoconstritores e a vasodilatadores, similar às existentes no choque séptico. Um esquema ilustrando os mecanismos que podem estar envolvidos neste fenômeno é apresentado na Figura 12. Em resumo, nosso modelo experimental permitiu-nos destacar o envolvimento de vasodilatadores endógenos, como a acetilcolina e a bradicinina, além do próprio NO, na falência progressiva da pressão arterial associada ao choque séptico. Uma importante informação fornecida pelo nosso estudo *in vivo* é que as alterações na responsividade vascular induzidas pelo NO envolvem, nas fases iniciais, a ativação de canais de K⁺, muito provavelmente do tipo voltagem-dependente. Por outro lado, embora a hiporresponsividade tardia (24 h) à fenilefrina seja revertida pela administração de TEA, esta parece não envolver nem canais de K⁺ voltagem-dependentes nem aqueles sensíveis ao ATP, desde que o tratamento com 4-aminopiridina e glibenclamida, respectivamente, não foi capaz de normalizar os efeitos vasoconstritores da fenilefrina. Quando administrados após a infusão de

SNP, tanto a 4-aminopiridina como o TEA reverteram apenas a potencialização dos efeitos das doses menores de bradicinina (3 nmol/kg), sugerindo que, neste caso, apenas pequenas doses deste peptídeo tem seus efeitos potencializados devido à ativação de canais de K⁺ e portanto, que outros mecanismos devem estar envolvidos nas alterações da reatividade vascular a este peptídeo. Finalmente, nossos dados demonstram que não é necessária uma liberação contínua e/ou de grandes quantidades de NO para deflagrar alterações na responsividade vascular. Desta forma, os efeitos do NO sobre as respostas a vasoconstritores e vasodilatadores são muito mais profundos, de longa duração e importantes do que previamente descrito. Se aplicados ao choque séptico, nossos resultados podem contribuir para uma melhor compreensão sobre a hiporresponsividade a vasoconstritores, além de confirmar a importância da hiper-responsividade a vasodilatadores nesta condição patológica. Estudos direcionados à relação entre o NO, modificações na atividade de canais de K⁺ e alterações no funcionamento cardiovascular podem propiciar novas perspectivas para o tratamento do choque séptico.

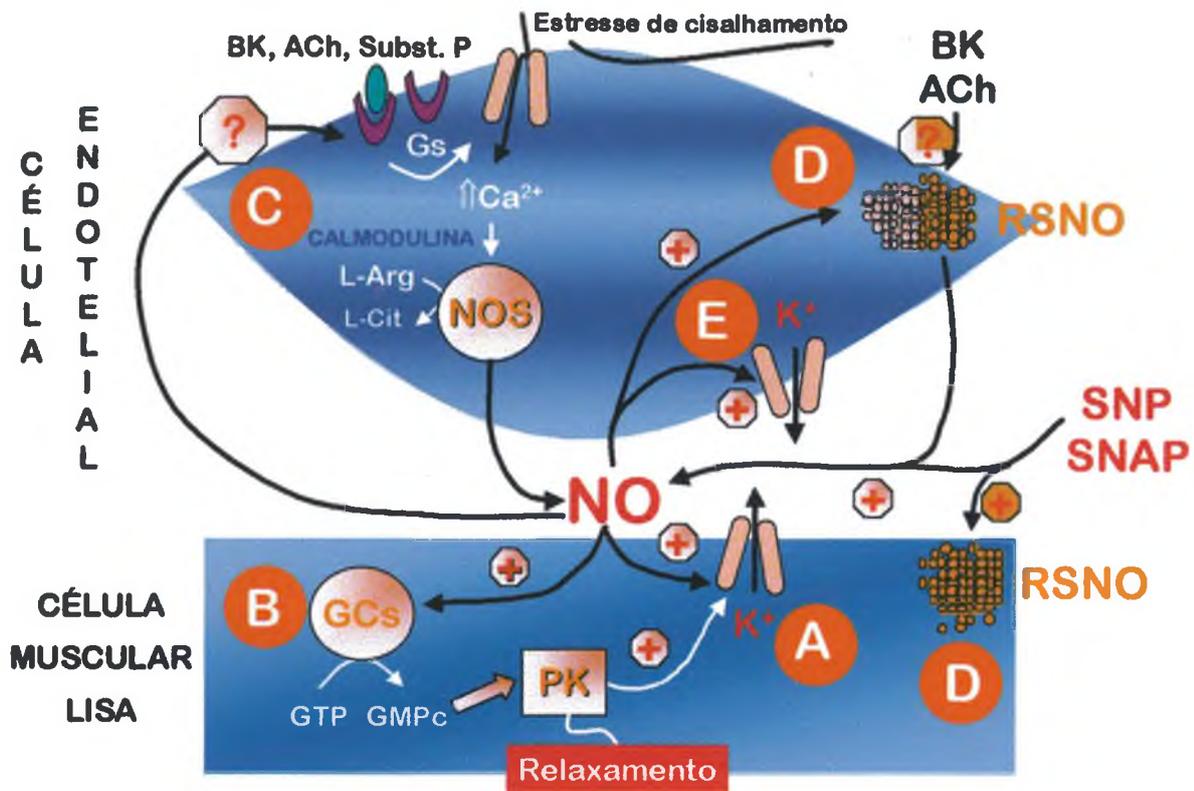


Figura 12: Modelo esquemático proposto para os possíveis mecanismos envolvidos nas alterações da responsividade vascular a vasoconstritores e a vasodilatadores induzidas pela infusão de doadores de óxido nítrico. Dentre seus inúmeros papéis fisiológicos, o óxido nítrico (NO), produzido por enzimas denominadas óxido nítrico sintases (NOS), é um importante modulador do tônus vascular. A ativação de receptores específicos presentes na membrana das células endoteliais, bem como a pressão que o sangue exerce sobre a parede dos vasos (estresse de cisalhamento), conduzem a um aumento nas concentrações intracelulares de cálcio e à formação do complexo cálcio-calmodulina, o que resulta na ativação da isoforma endotelial da NOS, que passa a produzir NO e L-citrulina durante curtos períodos de tempo (segundos), utilizando como substrato o aminoácido L-arginina e uma série de outros co-fatores (ver páginas 16-17). Imediatamente após ser liberado pela NOS endotelial, o NO propaga-se para as células do músculo liso vascular, induzindo a vasodilatação, em um processo que envolve a ativação da enzima guanilato ciclase solúvel (GCs), responsável pela produção de GMPc, molécula que ativa proteínas quinases (PK) específicas, as quais fosforilam a cadeia leve de actina e canais de potássio, eventos responsáveis ao menos por parte do processo de relaxamento vascular. Entretanto, a exposição do sistema cardiovascular a quantidades de NO superiores às fisiológicas, seja através da infusão de doadores de NO (nitroprussiato de sódio ou S-nitroso-N-acetil-DL-penicilamina), seja em virtude da indução da isoforma induzida da NOS (como ocorre em processos patológicos como o choque séptico), parece ter consequências diferentes, e induz alterações na capacidade do músculo liso vascular responder tanto a agentes vasoconstritores como vasodilatadores. Uma das maneiras pelas quais o NO proveniente dessas fontes pode alterar a responsividade vascular pode ser através de uma ação direta sobre canais de K⁺ presentes na membrana das células do músculo liso vascular. A abertura destes canais e a consequente saída de íons K⁺ pode criar um estado de hiperpolarização da célula muscular lisa, o que por sua vez explicaria tanto a hiporresponsividade a vasoconstritores como a potencialização dos efeitos de vasodilatadores endotélio dependentes (A). O NO pode ainda induzir alterações na função da enzima guanilato ciclase solúvel (GCs), além de alterar processos envolvidos na regulação do tônus vascular (B). Alternativamente, o NO pode induzir alterações no número ou na função de receptores ou mecanismos de transdução existentes na célula endotelial (C). O NO, liberado pelos doadores pode ainda interagir com tióis intracelulares, formando S-nitrosotióis, compostos capazes de liberar NO gradativamente. A liberação de NO destes estoques pré-formados poderia explicar porque as alterações na responsividade vascular persistem por até 24 h após o término da exposição aos doadores de NO (D). Finalmente, o NO pode também agir diretamente em canais de K⁺ das células endoteliais. A ativação destes canais poderia deflagrar importantes alterações na regulação do potencial de membrana e do tônus vascular (E).

VI – Considerações Finais

O choque séptico é uma síndrome de difícil controle que, na grande maioria dos casos, conduz à falência cardio-circulatória e à morte. Mesmo frente aos avanços da ciência e ao grande número de novos trabalhos publicados, é impossível avaliarmos quando a medicina estará apta a implementar terapias mais efetivas para esta patologia. Uma das razões para isto é a dificuldade de se aplicar, na prática clínica, as informações providas pela ciência.

O organismo, na tentativa de conter a infecção sistêmica que caracteriza o choque séptico, lança mão de diversos mediadores, dos quais alguns visam estabelecer um processo inflamatório e imunológico eficiente (como as citocinas pró-inflamatórias e o sistema complemento) e outros são liberados na tentativa de conter o desenvolvimento de uma inflamação descontrolada (como as citocinas antiinflamatórias). Infelizmente, nos casos mais graves, na “batalha” contra a origem da inflamação sistêmica, o organismo parece optar pelos riscos de manter um processo inflamatório exacerbado durante longos períodos, o que é um dos principais responsáveis pelos inúmeros sintomas deletérios do choque séptico.

Neste contexto, o óxido nítrico desponta como apenas um dos mediadores produzidos em grandes quantidades durante a sepsis. A hiporresponsividade a vasoconstritores, um sintoma bem conhecido do choque séptico, que faz com que pacientes hipotensos não tenham a pressão sanguínea normalizada, mesmo quando submetidos à administração de altas doses de vasoconstritores, é também apenas um dos inúmeros sintomas dessa patologia. Entretanto, cada pequeno achado

representa uma fração do que pode ser, em conjunto com inúmeros outros, uma boa conduta para uma terapia eficaz. Talvez, coletivamente, os esforços realizados nesta área possam, de alguma forma, contribuir para um futuro aumento nos índices de sobrevivência de pacientes com choque séptico.

VII – Conclusões

Os resultados aqui apresentados, obtidos através de experimentos utilizando a preparação de pressão arterial em ratos anestesiados, demonstraram que:

- a administração de LPS induz um estado de hiporreatividade vascular à fenilefrina e potencialização das respostas à bradicinina, o qual persiste por pelo menos 24 horas;
- a infusão de doadores de óxido nítrico (ambos SNP e SNAP) reduz a responsividade à fenilefrina e às angiotensinas I e II, além de potencializar as ações da bradicinina e da acetilcolina, reproduzindo as alterações na responsividade vascular presentes em ratos endotoxêmicos;
- a responsividade vascular à fenilefrina e à bradicinina permanece alterada por pelo menos 24 h após a infusão dos doadores de óxido nítrico;
- os efeitos vasodilatadores do iloprost e do nitroprussiato de sódio (dois vasodilatadores endotélio-independentes) não são alterados pela infusão de doadores de NO;
- o tratamento com TEA (um bloqueador inespecífico de canais de potássio) ou com 4-aminopiridina (um bloqueador de canais de potássio ativados por voltagem), *antes* da infusão de SNP, é capaz de proteger o sistema cardiovascular das alterações na responsividade vascular induzidas pelo óxido nítrico, enquanto a glibenclamida (um bloqueador de canais de potássio sensíveis ao ATP) não teve qualquer efeito;
- a administração de 4-aminopiridina ou de glibenclamida *após* a infusão de

SNP, quando os efeitos do óxido nítrico sobre a responsividade vascular à fenilefrina já estavam deflagrados, não foi capaz de restabelecer as respostas a este vasoconstritor;

- por sua vez, a administração de TEA foi capaz de restaurar os efeitos vasoconstritores deste agonista α_1 -adrenérgico, mesmo quando utilizado 24 h após a infusão de SNP, quando a responsividade à fenilefrina permanecia reduzida;
- tanto o TEA quanto a 4-aminopiridina, quando administrados após a infusão de SNP, foram capazes de reverter a potencialização dos efeitos da bradicinina, mas apenas quando pequenas doses dessa cinina eram testadas; os efeitos das doses maiores de bradicinina não foram alterados por esses bloqueadores de canais de potássio.

Os resultados sugerem que:

- os efeitos de quantidades de óxido nítrico superiores às fisiológicas sobre o sistema cardiovascular são muito mais profundos e duradouros do que previamente reconhecido; uma vez deflagradas as alterações na responsividade vascular decorrentes da exposição ao NO, estas persistem por longos períodos, independente da contínua produção de NO;
- como apenas vasodilatadores endotélio-dependentes têm seus efeitos potencializados pela infusão de doadores de NO, alterações no endotélio vascular podem ter importante participação na origem dos efeitos do NO sobre a responsividade vascular. Receptores e/ou estruturas envolvidas em mecanismos de transdução poder ter suas funções modificadas pelo

NO;

- alterações nos estoques intracelulares de S-nitrosotióis podem contribuir para os efeitos do NO sobre a responsividade vascular. Estes estoques podem liberar NO gradativamente, o que poderia justificar tanto a supressão das respostas vasoconstritoras como a potencialização das respostas vasodilatadoras a agentes endotélio-dependentes;
- a ativação de canais de potássio é responsável ao menos por parte das alterações da responsividade vascular induzidas pelo NO. Entretanto, nossos resultados não permitem conclusões acerca dos eventos envolvidos nos efeitos do NO sobre estes canais. Finalmente, outros mecanismos parecem contribuir, especialmente para a potencialização das ações da bradicinina, quando doses maiores desse peptídeo são utilizadas.

VI – Referências

- ABDERRAHMANE, A.; SALVAIL, D.; DUMOULIN, M.; GARON, J.; CADIEUX, A.; ROUSSEAU, E. Direct activation of K_{Ca} channel in airway muscle by nitric oxide: involvement of a nitrothiosylation mechanism? **Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.**, 19: 485-497, 1988.
- ABEL, F. L. Myocardial function in sepsis and endotoxin shock. **Am. J. Physiol.**, 257: R1265-R1281, 1989.
- ACKERMANN, A.; FERNANDEZ-ALFONSO, M. S.; SANCHEZ DE ROJAS, R.; ORTEGA, T.; PAUL, M; GONZALEZ, C. Modulation of angiotensin-converting enzyme by nitric oxide. **Br. J. Pharmacol.** 124: 291-298, 1998.
- ARCHER, S. L.; HUANG, J. M.; HAMPL, V.; NESLON, D. P.; SHULTZ, P. J.; WEIR E. K. Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 91: 7573-7587, 1994.
- AVONTUUR, J. A.; TUTEIN, N. R. P.; VAN BODEGOM, J. W.; BRUINING, H. A. Prolonged inhibition of nitric oxide synthesis in severe septic shock: a clinical study. **Crit. Care Med.**, 26: 660-667, 1998a.
- AVONTUUR, J. A.; TUTEIN, N. R. P.; BUIJK, S. L.; KANHAI, K. J.; BRUINING, H. A. Effects of L-NAME, an inhibitor of nitric oxide synthesis, on cardiopulmonary function in human septic shock. **Chest.**, 113: 1640-1646, 1998b.
- BAKER, C. C.; OPPENHEIMER, L.; STEPHENS, B.; LEWIS, F. R.; TRUNKEY, D. D. Epidemiology of trauma deaths. **Am. J. Surg.**, 140: 144-150, 1980.
- BAUERSACHS, J.; POPP, R.; HECKER, M.; SAUER, E.; FLEMING, I.; BUSSE, R. Nitric oxide attenuates the release of endothelium-derived hyperpolarizing factor. **Circulation**, 94: 3341-3347, 1996.
- BEAL, A. L. ; CERRA, F. B. Multiple organ failure syndrome in the 1990s. Systemic inflammatory response and organ dysfunction. **JAMA**, 271: 226-233, 1994.
- BENY, J. L.; BRUNET, P. C. Neither nitric oxide nor nitroglycerin accounts for all the characteristics of endothelially mediated vasodilation of pig coronary arteries. **Blood Vessels**, 25: 308-311, 1988.
- BERG, T.; SCHLICHTING, E.; ISHIDA, H; CARRETERO, O. A. Kinin antagonist does not protect against the hypotensive response to endotoxin, anaphylaxis or acute pancreatitis. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 251: 731-734, 1989.

- BERG, T.; KOTENG, O. Signalling pathways in bradykinin- and nitric oxide-induced hypotension in the normotensive rat; role of K⁺-channels. **Br. J. Pharmacol.**, 121: 1113-20, 1997.
- BOLOTINA, V. M.; NAJIBE, S.; PALACINO, J. J.; PAGANO, J. P.; COHEN, R. A. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. **Nature**, 368: 850-853, 1994.
- BONE, R. C. ; BALK, R. A. ; CERRA, F. B. ; DELLINGER, R. P. ; FEIN A. M. ; KNAUS, W. A. ; SCHEIN, R. M. ; SIBBALD, W. J. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. **Chest**, 101: 1644-1655, 1992.
- BHoola, K. D.; FIGUEROA, C. D.; WORTHY, K. Bioregulation of kinins: kallikreins , kininogens, and kininases. **Pharmacol. Rev.**, 44: 1-80, 1992.
- BRANDTZAEG, P. Significance and pathogenesis of septic shock. *In*: RIETSCHEL, E. T.; WAGNER, H. **Pathophysiology of septic shock. Current Topics in Microbiology and Immunology**, 216, Berlin: Springer Verlag, 16-37, 1996a.
- BRANDTZAEG, P.; OSNES, L.; ØVSTEØ, R.; JOØ, G.B., WESTVIK, A.B.; KIERULF, P. Net inflammatory capacity of human septic shock plasma evaluated by a monocyte based target cell assay. **J. Exp. Med.**, 184: 51-60, 1996b.
- BRAYDEN, J. E. Role of potassium channels in the channels in the vascular response to endogenous and pharmacological vasodilators. **Blood Vessels**, 28: 147-153, 1991.
- BRAYDEN, J. E. Potassium channels in vascular smooth muscle. **Clin. Exper. Pharmacol. Physiol.**, 23: 1069-1076, 1996.
- BRAYDEN, J. E.; QUAYLE, J. M.; STANDEN, N. B.; NELSON, M. T. Role of potassium channels in the vascular response to endogenous and pharmacological vasodilators. **Blood Vessels**, 28: 147-53, 1991.
- BUGA, G. M.; GRISCAVAGE, J. M.; ROGERS, N. E.; IGNARRO, L. J. Negative feedback regulation of endothelial cell function by nitric oxide. **Circ. Res.**, 73:808-812, 1993.
- BUTLER, A. R.; RHODES, P. Chemistry, analysis, and biological roles of S-nitrosothiols. **Analytical Biochemistry**, 249: 1-9, 1997.
- BUSSE, R.; FLEMING, I. Regulation and functional consequences of endothelial nitric oxide formation. **Annals of Medicine**, 27: 331-340, 1995.
- CAI, M.; SAKAMOTO, A.; OGAWA, R. Inhibition of nitric oxide formation with L-canavanine attenuates endotoxin-induced vascular hyporeactivity in the rat. **Eur. J. Pharmacol.**, 295: 215-220, 1996.

- CATTERALL, W. A.; SNUTCH, T. P.; THOMSEN, W.; ROSSIE, S. Structure and modulation of voltage-gated ion channels. **Ann. NY Acad. Sci.**, 625: 174-180, 1991.
- CHEN, C. H.; HOUCHI, H.; OHNAKA, M.; SAKAMOTO, S.; NIWA, Y.; NAKAYA, Y. Nitric oxide activates Ca²⁺-activated K⁺ channels in cultured bovine adrenal chromaffin cells. **Neurosci. Lett.**, 248: 127-129, 1998.
- CHEN, G.; SUZUKI, H.; WESTON, A. H. Acetylcholine releases endothelium-derived hyperpolarizing factor and EDRF from rat blood vessels. **Br. J. Pharmacol.**, 95: 1165-1174, 1988.
- CHEN, P. Y.; SANDERS, P. W. L-arginine abrogates salt-sensitive hypertension in Dahl/Rapp rats. **J. Clin. Invest.**, 88: 1559-1567, 1991.
- CHENG, X.; PANG, C. C. Y. Pressor and vasoconstrictor effects of methylene blue in endotoxaemic rats. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, 357: 648-653, 1998.
- CHERRY, P. D.; FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V.; JOTHIANANDAN, D. The role of endothelial cells in the relaxation of isolated arteries by bradykinin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 79: 2106-2110, 1983.
- CLANCY, R. M.; AMIN, A. R.; ABRAMSON, S. B. The role of nitric oxide in inflammation and immunity. **Arth. Rheumat.**, 41: 1141-1151, 1998.
- COOKE, J. P.; DZAU, V. J. Nitric oxide synthase: role in the genesis of vascular disease. **Annu. Rev. Med.**, 48: 489-509, 1997.
- CRANE, B. R.; ARVAI, A. S.; GACHHUI, R.; WU, C.; GHOSH, D. K.; GETZOFF, E. D.; STUEHR, D. J.; TAINER, J. A. The structure of nitric oxide synthase oxygenase domain and inhibitor complexes. **Science**, 278: 425-431, 1997.
- DAEMEN-GUBBELS, C. R.; GROENEVELD, P. H.; GROENEVELD, A. B. van KAMP, G. J.; BRONSVELD, W.; THIJS, L. G. Methylene blue increases myocardial function in septic shock. **Crit. Care Med.**, 23: 1363-1370, 1995.
- DALLOZ, F.; MAUPOIL, V.; LECOUR, S.; BRIOT, F.; ROCHETTE, L. *In vitro* studies of interactions of NO donor drugs with superoxide and hydroxyl radicals. **Mol. Cell. Bioch.**, 177: 193-200, 1997.
- DAVISSON, R.L.; BATES, J. N.; JOHNSON, A. K.; LEWIS, S. J. Use-dependent loss of acetylcholine- and bradykinin-mediated vasodilation after nitric oxide synthase inhibition. Evidence for preformed stores of nitric oxide-containing factors in vascular endothelial cells. **Hypertension**, 28: 354-360, 1996.

- DE FORGE, L. E.; NGUYEN, D. T.; KUNKEL, S. L.; REMICK, D. G. Regulation of the pathophysiology of tumor necrosis factor. **J. Lab. Clin. Med.**, 116: 429-438, 1990.
- DELA CADENA; R. A.; SUFFREDINI, A. F.; PAGE, J. D.; PIXLEY, R. A.; KAUFMAN, N.; PARRILLO, J. E.; COLMAN, R. W. Activation of the kallikrein-kinin system after endotoxin administration to normal human volunteers. **Blood**, 81, 3313-3317, 1993.
- DEL BOSCO, C. G. Physiological basis of the evolution and treatment of shock. **Medicina**, 58: 374-376, 1998.
- DERKX, B.; MARCHANT, A.; GOLDMAN, M.; BIJLMER, R.; VAN DEVENTER, S. High levels of interleukin-10 during the initial phase of fulminant meningococcal septic shock. **J. Infect. Dis.**, 171: 229-232, 1995.
- DIERKS, E. A.; BURSTYN, J. N. The deactivation of soluble guanylyl cyclase by redox-active agents. **Arch. Bioch. Bioph.**, 351: 1-7, 1998.
- DOMINIQUE, P.; STOCLET, J.C. Involvement of bradykinin and nitric oxide in the early hemodynamic effects of lipopolysaccharide in rats. **Shock**, 3: 376-379, 1995.
- DUBINSKY, J. M.; OXFORD, G. S. Dual modulation of potassium channels by thyrotropin-releasing hormone in clonal pituitary cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 90: 9659-9663, 1985.
- EDWARDS, G.; WESTON, A. H. Endothelium-derived hyperpolarizing factor – a critical appraisal. **Prog. Drug Res.**, 50: 109-133, 1998.
- ESCANDE, D.; STANDEN, N. K⁺ channels in cardiovascular medicine. **Trends Pharmacol. Sci.**, 15: 350, 1994.
- FANG, F. C. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. **J. Clin. Invest.**, 99: 2818-2825, 1997.
- FIELD, L.; DILTS, R. V.; RAVICHANDRAN, R.; LENHERT, P. G.; CARNAHAN, G. E. An unusually stable thionitrite from N-acetyl-D,L-penicillamine; X-ray crystal and molecular structure of 2-(acetylamino)-2-carboxy-1,1-dimethylethyl thionitrite. **J. Chem. Soc. Comm.**, 249-250, 1978.
- FINK, M. P. Therapeutic options directed against platelet activating factor, eicosanoids and bradykinin in sepsis. **J. Antimicrob. Chemother.**, 41: 81-94, 1998.
- FLEMING, I.; GRAY, G. A.; JULOU-SCHAEFFER, G.; PARRAT, J. R.; STOCLET, J. C. Incubation with endotoxin activates the L-arginine pathway in vascular tissue. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 171: 562-568, 1990.

- FLEMING, I.; JULOU-SCHAEFFER, G.; GRAY, G. A.; PARRATT, J. R.; STOCLET, J. Evidence that an L-arginine/nitric oxide dependent elevation of tissue cyclic GMP content is involved in depression of vascular reactivity by endotoxin. **Br. J. Pharmacol.**, 103: 1047-1052, 1991.
- FREER, R. J.; STEWART, J. M. In vivo pulmonary metabolism of bradykinin, angiotensin I and 5-hydroxytryptamine in the rat. **Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.**, 217: 97-109, 1975.
- FURCHGOTT, R. F. Role of endothelium in the responses of vascular smooth muscle. **Circ. Res.**, 53: 557-573, 1983.
- FURCHGOTT, R. F. The discovery of endothelium-dependent relaxation. **Circulation**, 87: V3-V8, 1993.
- FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, 288: 373-376, 1980.
- FURCHGOTT, R. F. The discovery of endothelium-derived relaxing factor and its importance in the identification of nitric oxide. **J. Amer. Assoc.**, 276: 1186-1188, 1996.
- GACHOT, B.; BEDOS, J. P.; VEBER, B.; WOLFF, M.; REGNIER, B. Short-term effects of methylene blue on hemodynamics and gas exchange in humans with septic shock. **Int. Care Med.**, 21: 1027-1031, 1995.
- GARDINER, S.M; KEMP, P.A.; MARCH, J.E; BENNETT; T. Cardiac and regional haemodynamics, inducible nitric oxide synthase (NOS) activity, and the effects of NOS inhibitors in conscious, endotoxaemic rats. **Br. J. Pharmacol.**, 116: 2005-2016, 1995.
- GARLAND, C. J.; PLANE, F.; KEMP, B. K.; COCKS, T. M. Endothelium-dependent hyperpolarization: a role in the control of vascular tone. **Trends Pharmacol. Sci.**, 16, 23-30, 1995.
- GASTON, B.; REILLY, J.; DRAZEN, J. M.; FACKLER, J.; RAMDEV, P.; ARNELLE D.; MULLINS, M. E.; SUGARBAKER, D. J.; CHEE, C.; SINGEL, D. J. et al. Endogenous nitrogen oxides and bronchodilator S-nitrosothiols in human airways. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 90: 10957-10961, 1993.
- GLIMAKER, M.; KRAGSBJERG, P.; FORSGREN, M.; OLCEN, P. Tumor necrosis factor-alpha (TNF alpha) in cerebrospinal fluid from patients with meningitis of different etiologies: high levels of TNF alpha indicate bacterial meningitis. **J. Infect. Dis.**, 167, 882-889, 1993.

- GRANGER, D. L.; HIBBS, J. B.; PERFECT, J. R.; DURACK, D. T. Metabolic fate of L-arginine in relation to microbistatic capability of murine macrophages. **J. Clin. Invest.**, 85: 264-273, 1990.
- GRATTON, J. P.; MAURICE, M. C.; RAE, G. A.; D'ORLEANS-JUSTE, P. Pharmacological properties of endothelins and big endothelins in ketamine/xylazine or urethane anesthetized rats. **Am. J. Hypertens.**, 8: 1121-1127, 1995.
- GRAY, G. A.; JULOU-SCHAEFFER, G.; OURY, K.; FLEMING, I.; PARRATT, J. R.; STOCLET, J. C. An L-arginine-derived factor mediates endotoxin-induced vascular hyporesponsiveness to calcium. **Eur. J. Pharmacol.**, 191: 89-92, 1990.
- GRAY, G. A.; SCHOOT, C.; JULOU-SCHAEFFER, G.; FLEMING, I.; PARRATT, J. R.; STOCLET, J. C. The effect of inhibitors of the L-arginine/nitric oxide pathway on endotoxin-induced loss of vascular responsiveness in anaesthetized rats. **Br. J. Pharmacol.**, 103: 1218-1224, 1991.
- GREEN, L. C.; LUZURIAGA, K. R.; WAGNER, D. A.; RAND, W.; ISTFAN, N.; YOUNG, V. R.; TANNENBAUM, S. R. Nitrate biosynthesis in man. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 78: 1764-1768, 1981a.
- GREEN, L. C.; TANNENBAUM, S. R.; GOLDMAN, P. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. **Sci. Wash. DC**, 212: 56-58, 1981b.
- GRIFFITH, O. W.; STUEHR, D. J. Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. **Annu. Rev. Physiol.**, 57: 707-736, 1995.
- GROENEVELD, A. B. J.; THIJS, L.G. Hemodynamic determinants of mortality in human shock. **Surgery**, 99: 140-152, 1986.
- HALL, S.; TURCATO, S.; CLAPP, L. Abnormal activation of K⁺ channels underlies relaxation to bacterial lipopolysaccharide in rat aorta. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 224: 184-190, 1996.
- HEMMENS, B.; MAYER, B. Enzymology of nitric oxide synthases. *In*: TITHERADGE, M. A. **Nitric oxide protocols**. Humana Press: Totowa, 1-32, 1998.
- HIBBS, J. B. JR.; TAINTOR, R. R.; VAVRIN, Z. Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. **Sci. Wash. DC**, 235: 473-476, 1987.
- HIBBS, J. B. JR.; TAINTOR, R. R.; VAVRIN, Z.; RACHLIN, E. M. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 157: 87-94, 1988.

- HOLLENBERG, S. M.; PIOTROWSKI, M. J.; PARRILLO, J. E. Nitric oxide synthase inhibition reverses arteriolar hyporesponsiveness to endothelin-1 in septic rats. **Am. J. Physiol.**, 272: R969-R974, 1997.
- HOM, G. J.; GRANT, S. K.; WOLFE, G.; BACH, T. J.; MACINTYRE, D. E.; HUTCHINSON, N. I. Lipopolissaccharide-induced hypotension and vascular hyporeactivity in the rat: tissue analysis of nitric oxide synthase mRNA and protein expression in the presence and absence of dexamethasone, NG-monomethyl-L-arginine or indomethacin. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 272: 452-459, 1995.
- HU, Z-W.; AZHAR, S.; HOFFMAN, B. B. Prolonged activation of alpha₁ adrenergic receptor-mediated smooth muscle contraction: role of the endothelium. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, 18: 151-157, 1992.
- HUANG, A. H.; BUSSE, R.; BASSENGE, E. Endothelium-dependent hyperpolarization of smooth muscle cells in rabbit femoral arteries is not mediated by EDRF: nitric oxide. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, 338: 438-442, 1988.
- HUANG, P. L., HUANG Z, MASHIMO, H.; BLOCH, K.D.; MOSKOWITZ, M. A., BEVAN, J. A.; FISHMAN, M. C. Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. **Nature**, 377: 239-242, 1995.
- IGNARRO, L. J. Regulation of cytosolic guanylyl cyclase by porphyrins and metalloporphyrins. **Adv. Pharmacol.**, 26:35-65, 1994.
- IGNARRO, L. J.; BALLOT, B.; WOOD, K. S. Regulation of soluble guanylate cyclase activity by porphyrins and metalloporphyrins. **J. Biol. Chem.**, 259 :6201-6207, 1984.
- IGNARRO, L. J.; BUGA, G. M.; WOOD, K. S.; BYRNS, R. E.; CHAUDHURI, G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 84: 9265-9269, 1987.
- IGNARRO, L. J.; DEGNAN, J. N.; BARICOS, W. H.; KADOWITZ, P. J.; WOLIN, M. S. Activation of purified guanylate cyclase by nitric oxide requires heme. Comparison of heme-deficient, heme-reconstituted and heme-containing forms of soluble enzyme from bovine lung. **Biochem. Biophys. Acta**, 718: 49-59, 1982.
- ISHIBASHI, T.; KAWADA, T.; KATO, K.; HAMAGUCHI, M.; IMAI, S. Contribution of activation of K⁺ channels to glyceryl trinitrate-induced relaxation of rabbit aorta. **Gen. Pharmac.**, 26: 543-552, 1995.
- ISLAM, M.S.; BERGGREN, P-Q.; LARSSON, O. Sulfhydryl oxidation induces rapid and reversible closure of the ATP-regulated K⁺ channel in the pancreatic β-cell. **FEBS Lett.**, 319: 128-132, 1993.

- JANSSEN, H.F.; PUGH, J.L.; LANGE, D.L. Bradykinin does not contribute to hypotension in early canine endotoxemia. **Circ. Shock**, 23: 197-204, 1987.
- JULOU-SCHAEFFER, G.; GRAY, G. A.; FLEMING, I.; SCHOTT, C.; PARRATT, J.R.; STOCLET, J.C. Loss of vascular responsiveness induced by endotoxin involves the L-arginine pathway. **Am. J. Physiol.**, 259: H1038-H1043, 1990.
- KATSUKI, S.; ARNOLD, W.; MITTAL, C.; MURAD, F.. Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine. **J. Cyclic. Nucl. Res.**, 3: 23-35, 1977.
- KELLER, R. S.; JONES, J. J.; KIM, K. F.; MYERS, P. R.; ADAMS, H. R.; PARKER, J. L.; RUBIN, L. J. Endotoxin-induced myocardial dysfunction: is there a role for nitric oxide? **Shock**, 4: 338-344, 1995.
- KELLY, R. A.; BALLIGAND, J-L.; SMITH, T. W. Nitric oxide and cardiac function. **Circ. Res.**, 79: 363-380, 1996.
- KIEHL, M. G.; OSTERMANN, H.; MEYER, J.; KIENAST, J. Nitric oxide synthase inhibition by L-NAME in leukocytopenic patients with severe septic shock. **Int. Care Med.**, 23: 561-566, 1997.
- KILBOURN, R. G.; JUBRAN, A.; GROSS, S. S.; GRIFFITH, O. W.; LEVI, R.; ADAMS, J.; LODATO, R. F. Reversal of endotoxin-mediated shock by N^G-Methyl-L-Arginine, an inhibitor of nitric oxide synthesis. **Bioch. and Bioph. Res. Commun.**, 172: 1132-1138, 1990.
- KILBOURN, R.G.; SZABÓ, C.; TRABER, D.L. Beneficial versus detrimental effects of nitric oxide synthase inhibitors in circulatory shock: lessons learned from experimental and clinical studies. **Shock** 7: 235-246, 1997.
- KLABUNDE, R. E.; COSTON, A. F. Nitric oxide synthase inhibition does not prevent cardiac depression in endotoxic shock. **Shock**, 3: 73-78, 1995.
- KLABUNDE, R. E.; RITGER, R. C. N^G-monomethyl-L-arginine (NMA) restores arterial blood pressure but reduces cardiac output in a canine model of endotoxic shock. **Bioch. Bioph. Res. Commun.**, 178: 1135-1140, 1991.
- KNAUS, W. A. ; DRAPER, E. A. ; WAGNER, D. P. ; ZIMMERMAN, J. E. Prognosis in acute organ-system failure. **Ann. Surg.**, 206: 685-693, 1985.
- KNOWLES, R. G.; MERRETT, M.; SALTER, M.; MONCADA, S. Differential induction of brain, lung and liver nitric oxide synthase by endotoxin in the rat. **Biochem. J.**, 270: 833-836, 1990.
- KNOWLES, R. G.; MONCADA, S. Nitric oxide synthases in mammals. **Biochem. J.**, 298:249-258, 1994.

- KNOWLES, R. G.; SALTER, M.; BROOKS, S. L.; MONCADA, S. Anti-inflammatory glucocorticoids inhibit the induction by endotoxin of nitric oxide synthase in the lung, liver and aorta of the rat. **Bioch. Bioph. Res. Commun.**, 172: 1042-1048, 1990.
- KOH, S. D.; CAMPBELL, J. D.; CARL, A.; SANDERS, K. M. Nitric oxide activates multiple potassium channels in canine colonic smooth muscle. **J. Physiol.**, 489: 735-743, 1995.
- KOMORI, K.; LORENZ, R. R.; VANHOUTTE, P. M. Nitric oxide, ACh, and electrical and mechanical properties of canine arterial smooth muscle. **Am. J. Physiol.**, 255: H207-H212, 1988.
- KRÖNCKE, K. D.; FEHSEL, K.; KOLB-BACHOFEN, V. Inducible nitric oxide synthase in human diseases. **Clin. Exp. Immunol.**, 113: 147-156, 1998.
- KROSL, P.; PRETORIUS, J.; REDL, H.; SCHLAG, G. Myocardial function in septic sheep. **Shock**, 1: 325-334, 1994.
- LAUBACH, V. E.; SHESELY, E. G.; SMITHIES, O.; SHERMAN, P. A. Mice lacking inducible nitric oxide synthase are not resistant to lipopolysaccharide-induced death. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 92: 10688-10692, 1995.
- LIAO, J. K.; HOMCY, C. J. The G proteins of the G alpha i and G alpha q family couple the bradykinin receptor to the release of endothelium-derived relaxing factor. **J. Clin. Invest.**, 92: 2168-2172, 1993.
- MARCEAU, F. Kinin B1 receptors: a review. **Immunopharmacology**, 30:1-26, 1995.
- MARCEAU, F.; GENDREAU, M.; BARABE, J.; ST-PIERRE, S.; REGOLI, D. The degradation of bradykinin (BK) and of des-Arg9-BK in plasma. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, 59: 131-138, 1981.
- MARCHANT, A.; DEVIÈRE, J. BYL, B.; DE GROOTE, D.; VINCENTE, J. L.; GOLDMAN, M. Interleukin-10 production during septicaemia. **Lancet**, 343: 707-708, 1994.
- MARÍN, J.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, A. Role of vascular nitric oxide in physiological and pathological conditions. **Pharmacol. Ther.**, 75: 111-134, 1997.
- MARLETTA, M. A.; YOON, P. S.; IYENGAR, R.; LEAF, C.D.; WISHNOK, J. S. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. **Biochemistry**, 27: 8706-8711, 1988.
- MARTIN, S.; MARUTA, K.; BURKAT, V.; GILLIS, S.; KOLB, H. IL-1 and IFN-gamma increase vascular permeability. **Immunology**, 64: 301-305, 1988.

- MANSHIP, L. ; MCMILLIN, R. D. ; BROWN, J. J. The influence of sepsis and multisystem and organ failure on mortality in the surgical intensive care unit. **Am. Surg.**, 50: 94-101, 1984.
- MAYER, B.; HEMMENS, B. Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. **Trends Biochem. Sci.**, 477-481, 1997.
- MCCALL, T. B.; BOUGHTON-SMITH, N. K.; PALMER, R. M. J.; WHITTLE, B. J. R.; MONCADA, S. Synthesis of nitric oxide from L-arginine by neutrophils. Release and interaction with superoxide anion. **Biochem. J.**, 261: 293-296, 1989.
- MCKENNA, T. M.; MARTIN F. M.; CHERNOW, B.; BRIGLIA, F. A. Vascular endothelium contributes to decreased aortic contractility in experimental sepsis. **Circ. Shock**, 19: 267-273, 1986.
- MERCIER, J. C. ; BEAUFILS, F. ; HARTMANN, J. F. Hemodynamic patterns of meningococcal shock in children. **Crit. Care Med.**, 16: 27-33, 1998.
- MICHEL, T.; FERON, O. Nitric oxide synthases: which, where, how and why? **J. Clin. Invest.**, 100: 2146-2152, 1997.
- MICHIE, H. R.; MANOGUE, K. R.; SPRIGGS, D. R.; REVHAUG, A.; O'DWYER, S.; DINARELLO, C. A.; CERAMI, A.; WOLFF, S. H.; WILMOR, D. W. Detection of circulating tumor necrosis factor after endotoxin administration. **N. Engl. J. Med.**, 318: 1481-1486, 1988.
- MISTRY, D. K.; GARLAND, C. J. Nitric oxide-induced activation of large conductance Ca²⁺-dependent K⁺ channels in smooth muscle cells isolated from the rat mesenteric artery. **Br. J. Pharmacol.**, 124: 1131-1140, 1998.
- MIYOSHI, H.; NAKAYA, Y. Endotoxin-induced noenedothelial nitric oxide activates the Ca²⁺-activated K⁺ channel in cultured vascular smooth muscle cells. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, 11: 1487-1495, 1994.
- MOMBOULI, J-V.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-derived hyperpolarizing factor(s): updating the unknown. **Trends Pharmacol. Sci.**, 18: 252-256, 1997
- MONCADA, S.; HIGGS, A.; FURCHGOTT, R. XIV. International union of pharmacology nomenclature in nitric oxide research. **Pharmacol. Rev.**, 49: 137-142, 1997.
- MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol. Rev.**, 43: 109-142, 1991.
- MORRIS, S. M. JR.; BILLIAR, T. R. New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis. **Am. J. Physiol.**, 266: E829-E839, 1994.

- MULDER, M. F.; van LAMBALGEN, A. A.; HUISMAN, E.; VISSER, J. J.; van DEN BOS, G. C.; THIJS, L. G. Protective role of NO in the regional hemodynamic changes during acute endotoxemia in rats. **Am. J. Physiol.**, 266: H1558-H1564, 1994.
- MURAD, F. Cyclic guanosine monophosphate as a mediator of vasodilation. **J. Clin. Invest.**, 78: 1-5, 1986.
- MURAD, F.; MITTAL, C. K.; ARNOLD, W. P.; KATSUKI, S.; KIMURA, H. Guanylate cyclase: activation by azide, nitro compounds, nitric oxide and hydroxyl radical and inhibition by hemoglobin and myoglobin. **Adv. Cyclic. Nucleot. Res.**, 9: 145-158, 1978.
- NASSIF, X.; MATHISON, J. C.; WOLFSON, E.; KOZIOL, J. A.; ULEVITCH, R. J., SO, M. Tumor necrosis factor alpha antibody protects against lethal meningococcaemia. **Mol. Microbiol.**, 6: 591-597, 1992.
- NAVA, E.; NOLL, G.; LÜSCHER, T. F. Nitric oxide in cardiovascular diseases. **Ann. Med.**, 27: 343-351, 1995.
- NAVA, E.; PALMER, R. M. J.; MONCADA, S. Inhibition of nitric oxide in septic shock: how much is beneficial? **Lancet**, 338: 1555-1557, 1991.
- NILIUS, B.; VIANA, F.; DROOGMANS, G. Ion channels in vascular endothelium. **Annu. Rev. Physiol.**, 59: 145-170, 1997.
- OKABE, K.; KITAMURA, K.; KURIYAMA, H. Features of 4-aminopyridine sensitive outward current observed in single smooth muscle cells from the rabbit pulmonare artery. **Pflugers Arch.**, 409: 561-568, 1987.
- OKADA, Y.; YANAGISAWA, T.; YAMAGISCHI, T.; TAIRA, N. K⁺ channel-opening action and KRN2391-induced reduction of Ca²⁺ sensitivity of arterial smooth muscle. **Arch. Internat. Pharmacod. Thé.**, 326: 33-51, 1993.
- PALMER, R. M. J.; ASHTON, D. S.; MONCADA, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. **Nature**, 333, 664-666, 1988.
- PALMER, R. M. J.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, 327: 524-526, 1987.
- PARK, J.E.; MEANS, G.E. Inactivation of angiotensin converting enzyme by sodium nitroprusside. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 145: 1048-1053, 1987.
- PARKER, M. M. Pathophysiology of vascular dysfunction in septic shock. **New. Horiz.**, 6: 130-138, 1998.

- PARRAT, J.R. Myocardial and circulatory effects of *E. coli* endotoxin: modification of responses to catecholamines. **Br. J. Pharmacol.**, 47: 12-25, 1973.
- PARRILLO, J. E. Pathogenetic mechanisms of septic shock. **N. Engl. J. Med.**, 328: 1471-1477, 1993.
- PARRILLO, J. E.; PARKER, M. M.; NATANSON, C.; SUFFREDINI, A. F.; DANNER, R. L.; CUNNION, R. E.; OGNIBENE, F. P. Septic shock in humans. Advances in the understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction, and therapy. **Ann. Intern. Med.**, 113: 227-241, 1990.
- PAYA, D.; STOCLET, J. C. Involvement of bradykinin and nitric oxide in the early hemodynamic effects of lipopolysaccharide in rats. **Shock**, 3: 376-379, 1995.
- PETERSSON, J.; ZYGMUNT, P. M.; HOGESTATT, E. D. Characterisation of the potassium channels involved in EDHF-mediated relaxation in cerebral arteries. **Br. J. Pharmacol.** 120: 1344-13444, 1997.
- PETROS, A.; LAMB, G.; LEONE, A.; MONCADA, S.; BENNETT, D.; VALLANCE, P. Effects of a nitric oxide synthase inhibitor in humans with septic shock. **Cardiov. Res.**, 28: 34-39, 1994.
- PINE, R. W. ; WERTZ, M. J. ; LENNARD, E. S. ; DELLINGER, E. P. ; CARRICO, C. J. ; MINSHEW, B. H. Determinants of organ malfunction or death in patients with intra-abdominal sepsis. A discriminant analysis. **Arch. Surg.**, 118: 242-249, 1983.
- PIOMELLI, O.; VOLTERRA, A.; DALE, N.; SIEGLEBAUM, S. A.; KANDEL, E. R. SCHWARTZ, J. H.; BELANDETTI, F. Lipoxygenase metabolites or arachidonic acid as second messengers for presynaptic inhibition of Aplysia cells. **Nature**, 328: 38-43, 1987.
- PIXLEY, R. A.; DELA CADENA, R.; PAGE, J. D.; KAUFMAN, N.; WYSHOCK, E. G.; CHANG, A.; TAYLOR, F. B.; COLMAN, R. W. The contact system contributes to hypotension but not disseminated intravascular coagulation in lethal bacteremia. **J. Clin. Invest.**, 91: 61-68, 1993.
- POMERANTZ, K.; CASEY, L.; FLETCHER, J.R.; RAMWELL, P.W. Vascular reactivity in endotoxin shock: effect of lidocaine or indomethacin pretreatment. **Adv. Shock Res.**, 7: 191-198, 1982.
- PRICE, J. M.; BAKER, C. H.; BOND, R. F. Calcium-activated potassium channel-mediated arteriolar relaxation during endotoxic shock. **Shock**, 7: 294-299, 1997.
- PROUD, D.; KAPLAN, A. P. Kinin formation: mechanisms and role in inflammatory disorders. **Annu. Rev. Immunol.**, 6: 49-83, 1988.

- QUINN, A. C.; PETROS, A. J.; VALLANCE, P. Nitric oxide: an endogenous gas. **Br. J. Anaest.**, 74: 443-451, 1995.
- RADOMSKI, M. W.; PALMER, R. M.; MONCADA, S. Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not the constitutive, nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 87: 10043-10047, 1990.
- RAYMOND, R. M. When does the heart fail during shock? **Circ. Shock**, 30: 27-41, 1990.
- REES, D. D. **The role of nitric oxide in the cardiovascular system**. 1991. PhD thesis, Inglaterra, National Academic Awards.
- REES, D. D.; MONKHOUSE, J. E.; CAMBRIDGE, D.; MONCADA, S. Nitric oxide and the haemodynamic profile of endotoxin shock in the conscious mouse. **Br. J. Pharmacol.**, 124: 540-546, 1998.
- REES, D. D.; PALMER, R. M. J.; MONCADA, S. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 86: 3375-3378, 1989.
- REGOLI, D. C.; BARABÉ, J. Pharmacology of bradykinin and related kinins. **Pharmacol. Rev.**, 32: 1-46, 1980.
- REGOLI, D. C.; MARCEAU, F.; LAVIGNE, J. Induction of B₁-receptors for kininins in the rabbit by a bacterial lipopolysaccharide. **Eur. J. Pharmacol.**, 71: 105-115, 1981.
- ROBAYE, B.; MOSSELMANS, R.; FIERS, W.; DUMONT, J. E.; GALAND, P. Tumor necrosis factor induces apoptosis (programmed cell death) in normal endothelial cells in vitro. **Am. J. Pathol.**, 138: 447-453, 1991.
- ROCK, C. S.; LOWRY, S. F. Tumor necrosis factor-alpha. **J. Surg. Res.**, 51: 434-445, 1991.
- ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. Respostas imunes mediadas por células. In: — **Imunologia**, 2 ed., São Paulo: Manole, 1992, p. 9.1-9.14.
- RUETTEN, H.; THIEMERMANN, C. Combination immunotherapy which neutralises the effects of TNF alpha and IL-1 beta attenuates the circulatory failure and multiple organ dysfunction caused by endotoxin in the rat. **J. Physiol. Pharmacol.**, 48: 605-621, 1997.
- RUPPERSBERG, J. P.; STOCKER, M.; PONGS, O.; HEINEMANN, S. H.; FRANK, R.; KOENEN, M. Regulation of fast inactivation of cloned mammalian I_{K(A)} channels by cysteine oxidation. **Nature**, 352: 711-714, 1991.

- SAKINIENE, E.; BREMELL, T.; TARKOWSKI, A. Inhibition of nitric oxide synthase (NOS) aggravates *Staphylococcus aureus* septicaemia and septic arthritis. **Clin. Exp. Immunol.**, 110: 370-377, 1997.
- SALTER, M.; KNOWLES, R.G.; MONCADA, S. Widespread tissue distribution, species distribution and changes in activity of Ca²⁺-independent nitric oxide synthases. **FEBS Lett.**, 291: 145-149, 1991.
- SCHMIDT, H. H. H. W.; LOHMANN, S. M.; WALTER, U. The nitric oxide and cGMP signal transduction system: regulation and mechanism of action. **Bioch. Bioph. Acta**, 1178: 153-175, 1993.
- SCHNEIDER, F.; LUTUN, P.; HASSELMANN, M.; STOCLET, J. C.; TEMPE, J. D. Methylene blue increases systemic vascular resistance in human septic shock. Preliminary observations. **Int. Care Med.**, 18: 309-311, 1992.
- SCHUGER, L.; VARANI, J.; MARKS, R. M.; KUNKEL, S. L.; JOHNSON, K. J.; WARD, P. A. Cytotoxicity of tumor necrosis factor-alpha for human umbilical vein endothelial cells. **Lab. invest.**, 61: 62-68, 1989.
- SCHULZ, R.; NAVA, E. MONCADA, S. Induction and potential biological relevance of a Ca²⁺-independent nitric oxide synthase in the myocardium. **Br. J. Pharmacol.**, 105: 575-580, 1992.
- SHESELY, E. G.; MAEDA, N.; KIM, H.-S.; DESAI, K. M.; KREGE, J. H.; LAUBACH, V. E.; SHERMAN, P. A.; SESSA, W. C.; SMITHIES, O. Elevated blood pressures in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 93: 13176-13181, 1996.
- STAMLER, J. S. Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. **Cell**, 78: 931-936, 1994.
- STEIN, B.; FRANK, P.; SCHMITZ, W.; SCHOLZ, H.; THOENES, M. Endotoxin and cytokines induce direct cardiodepressive effects in mammalian cardiomyocytes via induction of nitric oxide synthase. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, 28: 1631-1639, 1996.
- STRAND, O. A.; LEONE, A. M.; GIERCKSKY, K. E.; SKOVLUND, E.; KIRKEBOEN, K. A. N^G-monomethyl-L-arginine improves survival in a pig model of abdominal sepsis. **Crit. Care Med.**, 26: 1490-1499, 1998.
- STUEHR, D. J.; GROSS, S. S.; SAKUMA, I.; LEVI, R.; NATHAN, C. F. Activated murine macrophages secrete a metabolite of arginine with the bioactivity of endothelium-derived relaxing factor and the chemical reactivity of nitric oxide. **J. Exp. Med.**, 169: 1011-1020, 1989a.
- STUEHR, D. J.; KWON, N. S.; GROSS, S. S.; THIEL, B. A.; LEVI, R.; NATHAN, C. F. Synthesis of nitrogen oxides from L-arginine by macrophage cytosol:

- requirement for inducible and constitutive components. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 161: 420-426, 1989b.
- STUEHR, D. J.; MARLETTA, M. A. Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 82: 7738-7742, 1985.
- SUFFREDINI, A. F.; FROMM, R.E.; PARKER, M.M.; BRENNER, M.; KOVACS, J.A.; WESLEY, R.A.; PARRILLO, J.E. The cardiovascular response of normal humans to the administration of endotoxin. **New. Engl. J. Med.**, 321: 280-287, 1989.
- TAKAHASCHI, K.; ANDO, K.; ONO, A.; SHIMOSAWA, T.; OGATA, E.; FUJITA, T. Tumor necrosis factor-alpha induces vascular hyporesponsiveness in Sprague-Dawley rats. **Life Sci.**, 50: 1437-1444, 1992.
- TAKAKI, T.; UENO, A.; OH-ISHI, S. A hypotensive response induced by des-Arg⁹-bradykinin in young/norway rats pretreated with endotoxin. **Eur. J. Pharmacol.**, 274: 225-228, 1995.
- TARE, M.; PARKINGTON, H. C.; COLEMAN, H. A.; NEILD, T. O.; DUSTING, G. J. Hyperpolarization and relaxation of arterial smooth muscle caused by nitric oxide derived from endothelium. **Nature**, 346: 69-71, 1990.
- TAYLOR, S. G.; WESTON, A. H. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: a new endogenous inhibitor from the vascular endothelium. **Trends Pharmacol. Sci.**, 9: 272-274, 1988.
- TEALE, D. M.; ATKINSON, A. M. L-canavanine restores blood pressure in a rat model of endotoxic shock. **Eur. J. Pharmacol.**, 271: 87-92, 1992.
- THIJS, L.G., GROENEVELD, A.B.J., & HACK, C.E. Multiple organ failure in septic shock. In: RIETSCHEL, E. T.; WAGNER, H. **Pathophysiology of septic shock. Current Topics in Microbiology and Immunology**, 216, 209-237. Berlin: Springer Verlag, 1996.
- THIRSTRUP, S.; NIELSEN-KUDSK, J. E. Effects of K⁺ channel blockers on the relaxant action of dihydralazine, cromakalim and nitroprusside in isolated rabbit femoral arteries. **Eur. J. Pharmacol.**, 215: 177-183, 1992.
- TOKUMASU, T., UENO, A., OH-ISHI, S. A hypotensive response induced by des-Arg⁹-bradykinin in young brown/Norway rats pretreated with endotoxin. **Eur. J. Pharmacol.**, 274: 225-228, 1995.
- TRACEY, K. J.; BEUTLER, B.; LOWRY, S. F. et al. Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. **Science**, 234: 470-474, 1986.

- TRACEY, K. J.; FONG, Y.; HESSE, D. G. et al. Anti-cachetin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteremia. **Nature**, 330: 662-664, 187
- VALLANCE, P.; MONCADA, S. The role of endogenous nitric oxide in septic shock. **New Horizons.**, 1: 77-86, 1993.
- VALLANCE, P.; PALMER, R. M. J.; MONCADA, S. The role of induction of nitric oxide synthesis in the altered responses of jugular veins from endotoxaemic rabbits. **Br. J. Pharmacol.**, 106: 459-463, 1992.
- VAUGHN, M. W.; KUO, L.; LIAO, J. C. Estimation of nitric oxide production and reaction rates in tissue by use of a mathematical model. **Am. J. Physiol.**, 274: H2163-H2176, 1998.
- VINCENT, J. L. Cardiovascular alterations in septic shock. **J. Antimicrob. Chemother.**, 41: 9-15, 1998.
- VINCENT, J. L.; GRIS, P.; COFFERNILS, M.; LEON, M.; PINSKY, M.; REUSE, C. et al. Myocardial depression characterizes the fatal course of septic shock. **Surgery**, 111: 660-667, 1992.
- VINCENT, J. L.; WEIL, M. H.; PURI, V.; CARLSON, R. W. Circulatory shock associated with purulent peritonitis. **Am. J. Surg.**, 142: 262-270, 1981.
- WALLER, J.W.; GARDINER, S.M.; BENNETT, T. Regional haemodynamic responses to acetylcholine, methoxamine, salbutamol and bradykinin during lipopolysaccharide infusion in conscious rats. **Br. J. Pharmacol.**, 112: 1057-1064, 1994.
- WANG, Z. W.; NARA, M.; WANG, Y. X.; KOTLIKOFF, M. I. Redox regulation of large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels in smooth muscle cells. **J. Gen. Physiol.** 110: 35-44, 1997.
- WEIPERT, J.; HOFFMANN, H.; SIEBECK, M.; WHALLEY, E.T. Attenuation of arterial blood pressure fall in endotoxin shock in the rat using the competitive bradykinin antagonist Lys-Lys-[Hyp², Thi^{5,8}, DPhe]-Bk (B4148). **Br. J. Pharmacol.**, 94: 282-284, 1988.
- WEISEL, R. D. ; VITO, L. ; DENNIS, R. C. ; VALERI, C. R. ; HECHTMAN, H. B. Myocardial depression during sepsis. **Am. J. Surg.**, 133: 512-521, 1995.
- WENZEL, R. P.; PINSKY, M. R.; ULEVITCH, R. J.; YOUNG, L. Current understanding of sepsis. **Clin. Infect. Dis.**, 22: 407-412, 1996.
- WILSON, D. D.; GARAVILLA, L.; KUHN, W.; TOGO, J.; BURCH, R. M.; STERANKA, L. R. D-Arg-[Hyp³-D-Phe⁷]-Bradykinin, a bradykinin antagonist, reduces mortality in a rat model of endotoxic shock. **Circulatory Shock**, 27: 93-101, 1989.

- WRIGHT, C. E.; RESS, D. D.; MONCADA, S. Protective and pathological roles of nitric oxide in endotoxin shock. **Cardiov. Res.**, 26: 48-57, 1992.
- WU, C. C.; CHEN, S. J. SZABO, C.; THIEMERMANN, C.; VANE, J. R. Aminoguanidine attenuates the delayed circulatory failure and improves survival in rodent model of endotoxic shock. **Br. J. Pharmacol.**, 114: 1666-1672, 1995.
- WU, C. C.; CHEN, S. J.; YEN, M. H. Nitric oxid-independent activation of soluble guanylyl cyclase contributes to endotoxin shock in rats. **Am. J. Physiol.**, 275: H1148-H1157, 1998.
- WU, C. C.; RUETTEN, H.; THIEMERMANN, C. Comparison of the effects of aminoguanidine and N-nitro-L-arginine methyl ester on the multiple organ dysfunction caused by endotoxaemia in the rat. **Eur. J. Pharmacol.**, 300: 99-104, 1996.
- WU, C. C.; SZABÓ, C.; CEHN, S.J.; THIEMERMANN, C.; VANE, J. R. Activation of soluble guanylyl cyclase by a factor other than nitric oxide or carbon monoxide contributes to the vascular hyporeactivity to vasoconstrictor agents in the aorta of rats treated with endotoxin. **Bioch. Bioph. Res. Commun.**, 201: 436-442, 1994.
- YATANI, A.; CODINA, J.; BROWN, A. M.; BIRNBAUMER, L. Direct activation of mammalian atrial muscarinic potassium channels by GTP regulatory protein GK. **Science**, 235: 207-211, 1987.
- YUN, H. Y.; DAWSON, V.L.; DAWSON, T.M. Nitric oxide in health and disease of the nervous system. **Mol. Psychiatry**, 2: 300-310, 1997.
- ZELLNER, J. L.; SPINALE, F. G.; CRAWFORD, F. A. JR; COOK, J. A. Right ventricular dysfunction with acute experimental septic shock. **J. Surg. Res.**, 50: 93-99, 1991.
- ZHANG, H.; ROGIERS, P.; PREISER, J. C.; SPAPEN, H.; MANIKIS, P.; METZ, G.; VINCENT, J. L. Effects of methylene blue on oxygen availability and regional blood flow during endotoxic shock. **Crit. Care Med.**, 23: 1711-1721, 1995.
- ZHANG, J.; SNYDER, S. H. Nitric oxide in the nervous system. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, 35: 213-233, 1995.